



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας- Φυτικοχημείας Τροφίμων

«Συγκριτική μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα *in vitro*»



Πτυχιακή Εργασία

Χαρίκλειας Κουνδουράκη

Τριμελής Επιτροπή

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής
Καθηγητής

ΜΕΛΗ: Ανδριάννα Καλιώρα, Λέκτορας
Μπόσκου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Φεβρουάριος 2013



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας- Φυτικοχημείας Τροφίμων

« Συγκριτική μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης αφεψημάτων από Ελληνικά βότανα *in vitro*»

Πτυχιακή Εργασία

Χαρίκλειας Κουνδουράκη

Τριμελής Επιτροπή

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Νικόλαος Καλογερόπουλος, Αναπληρωτής
Καθηγητής

ΜΕΛΗ: Ανδριάννα Καλιώρα, Λέκτορας
Μπόσκου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Φεβρουάριος 2013

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας- Φυσικοχημείας Τροφίμων, του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στα πλαίσια του Προγράμματος Προπτυχιακών Σπουδών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή κ. Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Μετά την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά αρχικά τον Επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο για τις καινούριες γνώσεις που μου μετέδωσε αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η πάντα πρόθυμη, φιλική και υπομονετική του στάση με βοήθησαν να αισθάνομαι εποικοδομητικό αλλά ταυτόχρονα και ευχάριστο το εργαστηριακό κομμάτι της παρούσας εργασίας και να καταφέρω να την ολοκληρώσω με επιτυχία.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κα. Ανδριάννα Καλιώρα, τόσο για τις γνώσεις που μου παρείχε σχετικά με τις βιολογικές δοκιμές που απαιτούνταν για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά και για την προθυμία της να με βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή χρειαζόταν. Η φιλική της στάση συνέβαλε στο να ολοκληρωθεί ευχάριστα η παρούσα εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να πω ευχαριστώ στον Επίκουρο καθηγητή κ. Γεώργιο Μπόσκου, ο οποίος με βοήθησε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μου στο εργαστήριο καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν πάντοτε πρόθυμα και διαθέσιμα να με βοηθήσουν και να με κατατοπίσουν όποτε χρειαζόταν.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στην Υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κογιάννου, η οποία από την πρώτη στιγμή ήταν πρόθυμη να μου μεταδώσει τις γνώσεις της, να με βοηθήσει και να είναι δίπλα μου σε ό, τι χρειαζόμουν με τον καλύτερο τρόπο. Η υπομονή της, η αγάπη και η ένταση που τη διέκριναν σε αυτό που έκανε κάθε φορά καθώς και η φιλική και οικεία στάση της συνέβαλαν τα μέγιστα στο να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία μέσα σ' ένα ευχάριστο και ζεστό κλίμα και με ώθησε ακόμη περισσότερο στο να θέλω να διευρύνω τους ορίζοντες μου στο εργαστηριακό- ερευνητικό τμήμα του αντικειμένου μου ενώ κέρδισα και μια πραγματική φίλη στη ζωή μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά τον Υποψήφιο Διδάκτορα Παναγιώτη Κανέλλο και τη Διδάκτορα Αριστεά Γκιοξάρη για την πολύτιμη βοήθεια

και τις συμβουλές που μου παρείχαν ανά πάσα στιγμή αλλά και για τη φιλική τους στάση.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω την κα. Μαργαρίτα Χρηστέα για τη βοήθεια που μας παρείχε στις απαιτούμενες αιμοληψίες καθώς και όλους του εθελοντές που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση του εργαστηριακού τμήματος της εργασίας μου.

Ευχαριστώ, ακόμη, τον κ. Δημήτρη Τσακαλάκη για την ευγενική προσφορά των βοτάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω, επίσης σε κάποια αγαπημένα μου πρόσωπα για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους όλον αυτόν τον καιρό και ειδικότερα στο Γιάννη, το Θανάση, το Μιχάλη, την Ειρήνη, την Κωνσταντίνα και τη Ρούλα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Κατερίνα και Νίκο, καθώς και την αδερφή μου, Νάντια για την αγάπη, τη στήριξη τους και την παρουσία τους δίπλα μου κάθε στιγμή.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	9
Summary	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1.1 Φαρμακευτικά Φυτά- Βότανα	15
1.1.1 Γενικά Στοιχεία	15
1.2 Φυτοχημικά	16
1.2.1 Ορισμός	16
1.2.2 Ταξινόμηση των φυτοχημικών	17
1.2.3 Πολυφαινόλες.....	17
I) Φαινολικά οξέα.....	18
Iα) Βενζοϊκά οξέα.....	19
Iβ) Κινναμωμικά οξέα	19
II) Φλαβονοειδή	20
III) Κουμαρίνες	22
IV) Στιλβένια.....	23
1.2.4 Καροτενοειδή	24
1.2.5 Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή.....	26
1.2.6 Θειούχες Ενώσεις	26
1.3 Βιολογική Δραστικότητα των Φυτοχημικών.....	27
1.3.1 Εισαγωγή.....	27
1.3.2 Αντιαθηρογόνο και Αντιοξειδωτική Δράση	27
1.3.3 Αντιφλεγμονώδης Δράση	43
1.3.4 Άλλες Δράσεις.....	45
Αντικαρκινική Δράση.....	45
Δράσεις των Βοτάνων σε Γαστρεντερικές Διαταραχές.....	47
Αντιβακτηριακή/ Αντική Δράση των Βοτάνων	48
Δράσεις των Βοτάνων για Δερματικές Παθήσεις	50

Δράσεις των Βοτάνων σε Ψυχιατρικά Νοσήματα.....	50
1.4 Ελληνικά Φαρμακευτικά Φυτά	51
1.1.2.1 Αντωναΐδα ή Τεύκριο (<i>Origanum Microphyllum</i>)	53
1.1.2.3 Δενδρολίβανο (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	54
1.1.2.2 Δίκταμο (<i>Origanum dictamnus</i>)	55
1.1.2.4 Θρύμπα (<i>Satureja thymbra</i>).....	57
1.1.2.5 Θυμάρι (<i>Thymus vulgaris</i>)	58
1.1.2.6 Μαντζουράνα (<i>Origanum majorana</i>).....	60
1.1.2.7 Μελισσόχορτο (<i>Melissa officinalis</i>).....	61
1.1.2.8 Ρίγανη (<i>Origanum vulgare</i>)	62
1.1.2.9 Σπαθόχορτο ή Υπερικό (<i>Hypericum perforatum</i>)	63
1.1.2.10 Τσάι του Βουνού (<i>Sideritis syriaca</i>)	66
1.1.2.11 Φασκόμηλο (<i>Salvia officinalis</i>).....	67
1.1.2.12 Φλισκούνι (<i>Mentha pulegium</i>)	68
1.1.2.13 Χαμομήλι (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	73
2.1 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων Βοτάνων και Διαδικασία Παραλαβής Αφυδατωμένων Αφεψημάτων	75
2.2 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων	77
2.2.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων για τον έλεγχο βιοδραστικότητας	77
2.2.2 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων για τον έλεγχο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας	78
2.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs).....	79
2.3.1 Άμεση χρήση κυττάρων για έλεγχο της βιοδραστικότητας των αφεψημάτων.....	80
2.3.2 Ψύξη- Αποθήκευση κυττάρων- Απόψυξη.....	81
2.4 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των βοτάνων στις λιποπρωτεΐνες ορού	82
2.4.1 Παραλαβή ορού.....	82

2.5 Μέτρηση των επιπέδων της Γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)	83
2.5.1 Επίδραση στα PBMCs με διαλυτοποιημένα αφεψημάτα	83
2.6 Μέτρηση των επιπέδων του προφλεγμονώδους Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-α)	87
2.6.1 Διέγερση των κυττάρων και επίδραση με τα διαλύματα των αφεψημάτων	87
2.7 Μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 6 (IL-6).....	90
2.7.1 Διέγερση των κυττάρων και επίδραση με τα διαλύματα των αφεψημάτων	90
2.8 Στατιστική Ανάλυση- Επεξεργασία	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΙΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	94
3.1 Παραλαβή στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων.....	95
3.2 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού	96
3.3 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (LDH).....	100
3.4 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) από τα PBMCs	103
3.5 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α) από τα PBMCs	108
Επίλογος- Συμπεράσματα.....	114
Βιβλιογραφία.....	117

Περίληψη

Τα φαρμακευτικά φυτά και τα βότανα χρησιμοποιούνταν ήδη από την εποχή του Ιπποκράτη τόσο για την ευχάριστη γεύση που έδιναν κατά τις μαγειρικές παρασκευές όσο και για τις θεραπευτικές ιδιότητες που θεωρούνταν ότι διαθέτουν. Τους έχουν αποδοθεί πολλές ευεργετικές δράσεις όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, όπως αντιοξειδωτική, αντιαθηρογόνο, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και άλλες, οι οποίες υποστηρίζονται από επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Υπεύθυνα για τις δράσεις αυτές θεωρούνται τα διάφορα ενεργά συστατικά που έχουν προσδιοριστεί στα βότανα, τα οποία είναι γνωστά με τον όρο *φυτοχημικά* και στα οποία περιλαμβάνονται οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή και τα τερπενοειδή. Τα ενεργά αυτά συστατικά έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται έρευνες για τον προσδιορισμό τόσο της χημικής τους σύστασης αλλά και των οφελών που μπορούν να παρέχουν στον άνθρωπο σχετικά με την πρόληψη ασθενειών, την ανακούφιση μεγάλου εύρους συμπτωμάτων ή τη χρήση τους ως εναλλακτική ή και συμπληρωματική μορφή θεραπείας.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να εξετάσει την ικανότητα αφεψημάτων από βότανα της Ελληνικής μικροχλωρίδας να αναστέλλουν την παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) αλλά και να επιβραδύνουν την επαγόμενη από χαλκό οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στον ορό *in vitro*. Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των αφεψημάτων μέσω της μέτρησης των επιπέδων του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Τα βότανα που μελετήθηκαν ήταν τα ακόλουθα: Αντωνιάδα (*Origanum microphyllum*), Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), Δίκταμο (*Origanum Dictamnus*), Θρύμπα (*Satureja thymbra*), Θυμάρι (*Thymus vulgaris*), Μαντζουράνα (*Origanum majorana*), Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), Ρίγανη (*Origanum vulgare*), Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*), Τσάι του Βουνού (*Sideritis syriaca*), Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), Φλισκούνη (*Mentha pulegium*) και Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*).

Από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα:

- Όλα τα αφεψήματα εμφάνισαν ελάχιστη κυτταροτοξικότητα, η Αντωναΐδα την υψηλότερη σε μεγασώσεις.
- Τα αφεψήματα Ρίγανης, Μελισσόχορτου, Θρύμπα και Δίκταμου αυξάνουν σημαντικά το χρόνο οξείδωσης (Lag time) των λιποπρωτεϊνών του ορού.
- Τα αφεψήματα από Ρίγανη, Φλισκούνι, Φασκόμηλο και Χαμομήλι προκαλούν μείωση της έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α).
- Τα αφεψήματα Δίκταμου, Σπαθόχορτου, Χαμομηλιού και Ρίγανης μειώνουν τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 (IL-6).

Τα αποτελέσματα μετά από στατιστική επεξεργασία αποδείχθηκαν ότι είναι στατιστικά σημαντικά, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$.

Summary

Medicinal plants and botanicals have been used since Hippocrates' time not only for the pleasant taste and flavor they lent to culinary concoctions but also for the therapeutic properties they were thought to possess. Scientists have attributed to these botanicals many beneficial effects on health such as antioxidant and antiatherogenic effects, antibacterial, anti-inflammatory and anticancer activities, etc, all supported by epidemiological studies which have been carried out the last few years. Responsible for all the above effects have been considered some active ingredients of the medicinal plants, known as *phytochemicals*. These include among others, polyphenols, carotenoids and terpenoids. These bioactive compounds have triggered the interest of the scientific community and as result much research has been carried out to determine their chemical structure and the potential benefits towards the prevention of several diseases and pathologies, the relief of a wide range of symptoms as well as their use as alternative or complementary treatment.

Considering the foregoing data, the purpose of this graduate thesis is to examine/ study the capacity of infusions obtained from common medicinal herbs of Greek microflora to inhibit the production of pro-inflammatory agents such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) and their ability to retard the copper-induced oxidation of human serum low density lipoproteins (LDL) in vitro. Moreover, the cytotoxicity of herbal infusions was assayed by measuring the levels of the lactate dehydrogenase (LDH) secreted from the injured cells. The herbs included in this work were the following: *Origanum microphyllum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum dictamnus*, *Satureja thymbra*, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Hypericum perforatum*, *Sideritis syriaca*, *Salvia officinalis*, *Mentha pulegium* and *Matricaria chamomilla*.

Interpretation of the results led to the following conclusions for the herb infusions that were studied:

- All the infusions caused minimum cytotoxicity, apart from *Origanum microphyllum* which caused >10% cytotoxicity in high doses.

- The infusions of *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Satureja thymbra* and *Origanum dictamnus* caused a noteworthy increase in the lagtime of the copper-induced oxidation of serum low density lipoproteins.
- The infusions of *Origanum vulgare*, *Mentha pulegium*, *Salvia officinalis* and *Matricaria chamomilla* were able to reduce the secretion of tumor necrosis factor (TNF- α) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).
- Infusions of *Origanum dictamnus*, *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla* and *Origanum vulgare* reduced the secretion of the cytokine interleukin-6 (IL-6) from PBMCs.

The results found statistically significant after statistical analysis, where the level of statistical significance, p , was set at $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Φαρμακευτικά Φυτά- Βότανα

1.1.1 Γενικά Στοιχεία

Φαρμακευτικό φυτό καλείται κάθε φυτό που περιέχει ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά τα οποία έχουν την ικανότητα να προλαμβάνουν ή να ανακουφίζουν ασθένειες (*Strivastava et al., 1996*). Αρωματικά φυτά είναι μια μεγάλη ομάδα φυτικών ειδών που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την περιεκτικότητα αιθέριων ελαίων σε διάφορα μέρη τους. Γενικότερα, ως αρωματικό φυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί κάθε φυτό ποώδες ή ξυλώδες εφόσον διαθέτει ένα ή περισσότερα μέρη που είναι αρωματικά. Η χρήση του κοινού όρου φαρμακευτικά-αρωματικά φυτά δηλώνει ότι όπως τα αρωματικά φυτά έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες, έτσι και τα φαρμακευτικά είναι συνήθως αρωματικά και δεν υπάρχει διαχωρισμός αυτών σε ξεχωριστές κατηγορίες.

Τα φαρμακευτικά φυτά πολύ συχνά ονομάζονται και βότανα. Ανατρέχοντας στον ορισμό του βοτάνου όπως αυτός δόθηκε από το λεξικό της Οξφόρδης βλέπουμε ότι βότανο είναι αυτό το φυτό του οποίου τα διάφορα μέρη (φύλλα-μίσχοι- άνθη) χρησιμεύουν ως τροφή ή θεραπεία χάρη στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Στη σύγχρονη εποχή, ο όρος βότανο χρησιμοποιείται μόνο για εκείνα τα φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και τη φαρμακολογία είτε σε μορφή εκχυλίσματος, είτε σε μορφή αφεψημάτος, είτε σε μορφή σκευασμάτων στα οποία υπάρχουν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλα συστατικά που συμβάλλουν στην ευεξία και την καλύτερη υγεία. Τα βότανα χρησιμοποιούνται, επίσης, ως συστατικά σε είδη καλλωπισμού.

Ο Ιπποκράτης (460-375 π. Χ) ήταν ο πρώτος που συστηματοποίησε και δημιούργησε την πρώτη ιστορικά καταγεγραμμένη ταξινόμηση και ομαδοποίηση των φυτών και μάλιστα, σύμφωνα με έρευνες, ήταν από τους πρώτους που εφήρμοσαν την ιατρική με επιστημονικές μεθόδους στην οποία χρησιμοποιούσε συχνά βότανα στις θεραπευτικές του αγωγές. Ο ίδιος αναφέρθηκε σε 236 διαφορετικές φαρμακευτικές ουσίες που προέρχονταν από βότανα (*Leventin & McMahon, 2003*). Σύμφωνα με την Ιπποκρατική θεωρία «Αν οι άνθρωποι ζούσαν σωστά και τρέφονταν σωστά, τότε δεν θα υπήρχε η ιατρική, επειδή απλώς, δε θα υπήρχαν αρρώστιες». Για τους αρχαίους Έλληνες ο διαχωρισμός ανάμεσα στην τροφή και το φάρμακο ήταν

δύσκολη υπόθεση και σύμφωνα με την παραπάνω θεωρία η τροφή ήταν μαζί και φάρμακο και διαδραμάτιζε σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου.

Όπως περιγράφεται και παραπάνω, ήδη από το 2800 π. Χ, τα βότανα και τα καρυκεύματα χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικούς σκοπούς με εμπειρικό κυρίως τρόπο (Ritchie, 2007). Ο «παραδοσιακός» αυτός τρόπος αντιμετώπισης διαφόρων καταστάσεων που αφορούσαν στην υγεία προκάλεσε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών να εντοπίσουν που οφείλεται αυτή η ευεργετική δράση των βοτάνων και των καρυκευμάτων. Στις μέρες μας, κάποιες από αυτές τις χρήσεις δε βρίσκουν πια εφαρμογή ενώ ερευνώνται και αποκαλύπτονται εκ νέου σε σύγχρονες επιστημονικές βάσεις επιπλέον χρησιμότητες των διαφόρων φυτών που μπορούν να έχουν ευεργετική δράση στην πρόληψη ή την ίαση ασθενειών ή απλά στην περιποίηση και την ενίσχυση του ανθρώπινου οργανισμού. Έχει αποδειχθεί πλέον ότι τα ωφέλιμα αποτελέσματα που έχει η χρήση αυτών των φυτικών προϊόντων οφείλονται σε χημικά συστατικά που περιέχουν και τα οποία είναι γνωστά ως φυτοχημικά.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότεροι είναι οι μελετητές που ασχολούνται με τα βότανα και τις πολλαπλές χρήσεις αυτών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είμαστε πλέον σε θέση να γνωρίζουμε πληρέστερα τις ιδιότητες και τα μικροσυστατικά τους που τα κάνουν τόσο ωφέλιμα για την υγεία μας.

1.2 Φυτοχημικά

1.2.1 Ορισμός

Οι ευεργετικές δράσεις στην υγεία έχει βρεθεί ότι αποδίδονται σε ένα πλήθος ενώσεων, τα λεγόμενα φυτοχημικά. Με τον όρο αυτό εννοούμε τα χημικά συστατικά που απαντώνται με φυσικό τρόπο μόνο στα φυτά και τα φυτικά τρόφιμα. Ένα φυτικό προϊόν είναι πιθανό να διαθέτει πλήθος φυτοχημικών ουσιών, οι οποίες έχουν ως βασικό ρόλο να προστατεύουν το ίδιο το φυτό από κινδύνους όπως είναι διάφορα μικρόβια, παράσιτα, η ακτινοβολία UV, οι υψηλές θερμοκρασίες, ενώ είναι αυτές που προσδίδουν το χρώμα στα φυτά καθώς και άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως είναι, το άρωμα και η γεύση (Toguri et al., 1993 & Peters et al., 1999 & Visioli et al., 2000). Το διατροφικό τους ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι παρέχουν

ειδικά οφέλη για την υγεία και τη διατήρηση της ευεξίας συμβάλλοντας στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer καθώς και η λειτουργική φθορά που επέρχεται λόγω ηλικίας. Ωστόσο, τα συστατικά αυτά, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες Οδηγίες του Αμερικάνικου Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (US FDA Guidelines), δε θεωρούνται θρεπτικές ουσίες καθώς δεν είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής.

1.2.2 Ταξινόμηση των φυτοχημικών

Τα φυτοχημικά κατατάσσονται στις ακόλουθες πέντε βασικές κατηγορίες:

- Πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, κουμαρίνες, ταννίνες, στιλβένια),
- Καροτενοειδή (α- και β- καροτένιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, ασταξανθίνη)
- Αλκαλοειδή (αζωτούχες ενώσεις όπως, πυριδίνες, πουρίνες, κινολίνες, ισοκινολίνες, τερπενοειδή, στεροειδή)
- Θειούχες οργανικές ενώσεις (θειούχα αλλύλια, ινδόλες)
- Άλλες αζωτούχες ενώσεις

Από αυτές οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή έχουν μελετηθεί περισσότερο.

1.2.3 Πολυφαινόλες

Ο όρος πολυφαινόλες χρησιμοποιείται ήδη από το 1894. Τα τελευταία χρόνια οι πολυφαινόλες της διατροφής έχουν προσελκύσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων λόγω της σημασίας τους στην ανθρώπινη υγεία (Milner, 1994 & Duthie & Brown, 1994). Αποτελούν μια κατηγορία φυσικών συστατικών που συναντώνται στα φυτά και σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, ο καφές, το τσάι, η σοκολάτα και το κόκκινο κρασί σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Σήμερα έχουν

αναγνωριστεί τουλάχιστον 8000 πολυφαινολικές ενώσεις ως συστατικά των φυτικών οργανισμών (Bravo, 1998 & Tsao, 2010).

Αν και οι πολυφαινόλες χημικά θεωρούνται ομάδα ενώσεων με φαινολικά χαρακτηριστικά, εντούτοις παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και περιέχουν πολλές υπο-ομάδες φαινολικών ενώσεων (Tsao, 2010). Δύο θεωρούνται οι πιθανές συνθετικές οδοί των φαινολικών ενώσεων, αυτή του οξικού άλατος και αυτή του σικιμικού (Visioli et al., 2000). Διακρίνονται ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους, τη βιολογική τους λειτουργία και τη χημική τους δομή στις παρακάτω κατηγορίες (Taiz & Zeiger, 2006):

- I. Φαινολικά οξέα
- II. Φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, νεοφλαβονοειδή, χαλκόνες, ανθοκυανίνες, κατεχίνες)
- III. Κουμαρίνες
- IV. Στιλβένια

Οι φαινολικές ενώσεις μαζί με τα τερπένια (αλκαλοειδή) και τις αζωτούχες ενώσεις υπάρχουν στα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες με βασικό ρόλο να τα προστατεύουν από άλλους οργανισμούς (Taiz & Zeiger, 2006 & Tsao, 2010).

Θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορούν να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες παρέχοντας ηλεκτρόνιο ή άτομο υδρογόνου. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες που υπάρχουν στα φρούτα και τα λαχανικά είναι εκείνες που συμβάλλουν περισσότερο στην αντιοξειδωτική δράση αυτών των τροφίμων συγκριτικά με τη βιταμίνη C (Wang et al., 1996).

I) Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι μη φλαβονοειδείς πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν περαιτέρω να διαχωριστούν σε 2 υπο-κατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C1-C6) και τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (C3-C6). Και οι δυο κατηγορίες έχουν έναν αρωματικό δακτύλιο ως βασικό σκελετό, ο οποίος είναι υποκατεστημένος με καρβοξύλιο στην περίπτωση των βενζοϊκών οξέων και από ένα προπενοϊκό οξύ στην περίπτωση του κινναμωμικού οξέος (Bravo, 1998 & Liu, 2004).

Θεωρούνται μεταβολίτες του σικιμικού οξέος και, επομένως, παράγονται από την αντίστοιχη βιοσυνθετική οδό ενώ προέρχονται και από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, το οποίο είναι και το ίδιο παράγωγο του μονοπατιού του σικιμικού οξέος.

Τα οξέα αυτά δε βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στα φυτά αλλά μπορούν να απελευθερωθούν ή να υδρολυθούν με όξινη ή αλκαλική υδρόλυση ή και από ένζυμα (Tsao, 2010). Οι καρβοξυλομάδες τους μετασχηματίζονται σε εστέρες και αμίδια ενώ οι υδροξυλομάδες που φέρουν είναι πολύ δραστικές.

Παράγονται από εξειδικευμένα κύτταρα και χαρακτηρίζονται από αυξημένες αντιοξειδωτικές, αντικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

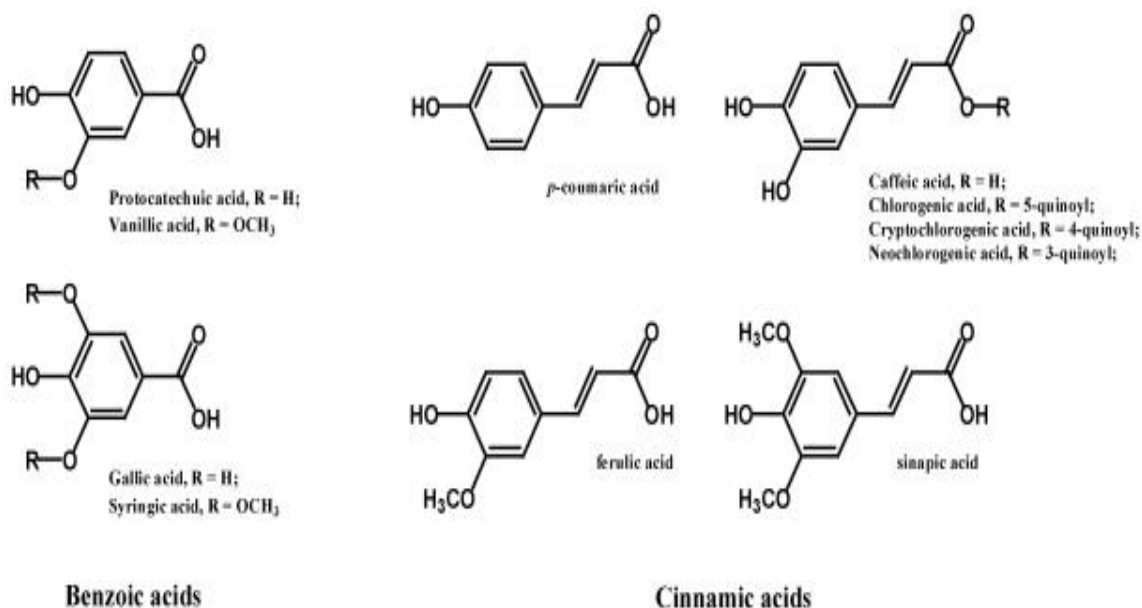
Iα) Βενζοϊκά οξέα

Τα οξέα αυτά δε βρίσκονται ελεύθερα στη φύση. Συμμετέχουν στη δομή των ταννινών και αποτελούν ένα από τα κύρια συστατικά τους. Τα κύρια οξέα αυτής της κατηγορίας είναι το βανιλικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το p- υδροξυ- βενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό και το συριγγικό οξύ.

Iβ) Κινναμωμικά οξέα

Αυτά σχηματίζονται από τη φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη και μπορούν να βρεθούν τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και γλυκοζίτες των κινναμωμικών οξέων στους οποίους το σάκχαρο είναι η γλυκόζη ενώ ορισμένοι εστέρες των κινναμωμικών οξέων με τρυγικό οξύ αποτελούν υποστρώματα οξειδωσης. Όταν σχηματίζουν εστέρες με κινικό οξύ, τρυγικό οξύ ή παράγωγα σακχάρων καλούνται χλωρογενικά οξέα (Liu, 2004, Cheynier, 2005). Τα πιο γνωστά κινναμωμικά οξέα είναι το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ.

Παρακάτω (Εικόνα 1.1) παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα φαινολικών οξέων.



Εικόνα 1.1: Χαρακτηριστικές δομές ορισμένων φαινολικών οξέων.

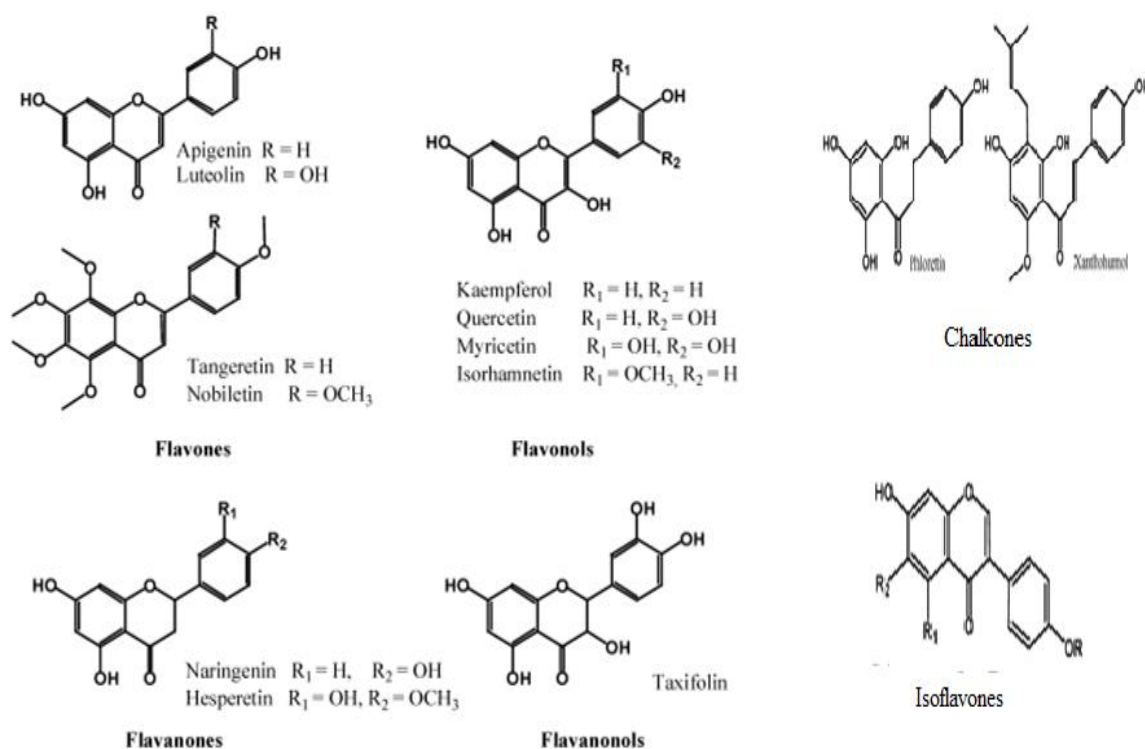
II) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Από τις 8000 πολυφαινόλες που είναι γνωστές σήμερα, οι 4000 κατατάσσονται στα φλαβονοειδή (Bravo, 1998 & Harborn & Williams, 2000 & Cheynier, 2005). Όλα τα φλαβονοειδή έχουν παρόμοιο βασικό σκελετό. Η γενική τους δομή είναι C6-C3-C6, δηλαδή φέρουν 2 αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) στα άκρα οι οποίοι ενώνονται με 3 άτομα άνθρακα προς έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (C) (Ross & Kasum, 2002, Liu, 2004). Λόγω της ύπαρξης διαφόρων τύπων υδροξυλίωσης στο δακτύλιο C προκύπτουν υποκατηγορίες των φλαβονοειδών: οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες (απιγενίνη), οι φλαβονόνες (βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή), οι φλαβανόλες (στις οποίες ανήκουν οι ταννίνες και προανθοκυανιδίνες) και οι φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπερόλη) (Manach et al., 2004). Αν και τα φλαβονοειδή στην πλειοψηφία τους έχουν το δακτύλιο Β ενωμένο με τον C2 του δακτυλίου C, μερικά όπως οι ισοφλαβόνες και τα νεοφλαβονοειδή έχουν ενωμένο το δακτύλιο Β με τον ετεροκυκλικό δακτύλιο C στις θέσεις 3 και 4 του δακτυλίου C αντίστοιχα και απαντώνται στα φυτά. Οι χαλκόνες αν και στερούνται ετεροκυκλικού δακτυλίου, κατατάσσονται στα φλαβονοειδή και στα φυτά ανευρίσκονται με τη μορφή γλυκοζιτών. Οι ταννίνες θεωρούνται ότι είναι συμπυκνωμένες μορφές, με Μοριακό Βάρος > 500, και όταν υδrolυθούν δίνουν

γλυκόζη και γαλλικό οξύ. Ο καφές και το τσάι είναι πλούσια σε ταννίνες. Παρουσία μεταλλικών ιόντων (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}) οι ταννίνες δίνουν σκούρα παράγωγα, ιδιότητα στην οποία αποδίδεται το σκούρο χρώμα των ροφημάτων.

Από τις υποκατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες αποτελούν τις πιο διαδεδομένες στη φύση. Οι φλαβανόλες συχνά αποκαλούνται κατεχίνες (κατεχίνη και επικατεχίνη) (Μπόσκου, 2004). Οι δύο αυτές ομάδες κατεχινών μπορούν να σχηματίζουν πολυμερή, τα οποία καλούνται προανθοκυανιδίνες οι οποίες θεωρούνται συμπυκνωμένες ταννίνες.

Στην Εικόνα 1.2 παρατίθενται οι δομές των διαφόρων υποκατηγοριών των φλαβονοειδών :



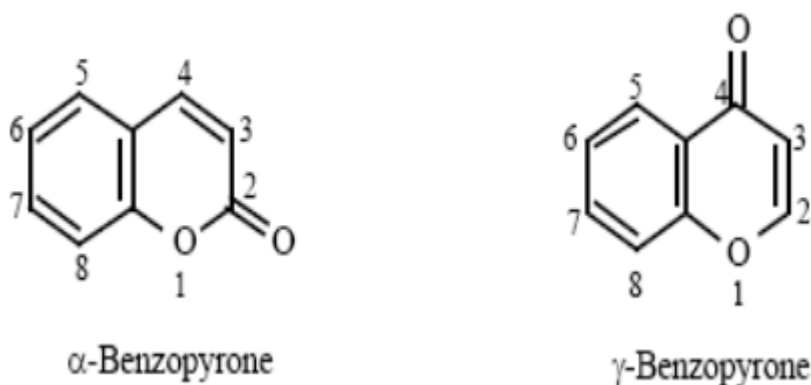
Εικόνα 1.2: Δομές και υποκατηγορίες φλαβονοειδών

Οι φλαβανόλες και τα ολιγομερή αυτών πιστεύεται ότι έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και κατ' επέκταση προσφέρουν σημαντικά οφέλη για την υγεία.

III) Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι αρωματικές ενώσεις οι οποίες ανήκουν στις διαιτητικές πολυφαινόλες. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός βενζοϊκού δακτυλίου ο οποίος συνδέεται με έναν πυρονικό δακτύλιο σχηματίζοντας τις βενζοπυρόνες. Οι βενζοπυρόνες με τη σειρά τους διακρίνονται σε α -βενζοπυρόνες και γ -βενζοπυρόνες, με τις κουμαρίνες να ανήκουν στην πρώτη υποκατηγορία και τα φλαβονοειδή στη δεύτερη (Lacy & O' Kennedy, 2004). Υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στα φυτά, ωστόσο εντοπίζονται και σε αρκετούς μικροοργανισμούς και σε ζωικές πηγές (Borges et al., 2005).

Στην εικόνα 1.3 παρουσιάζονται οι δομές των α - και γ -βενζοπυρονών.



Εικόνα 1.3: Δομή βενζοπυρονών

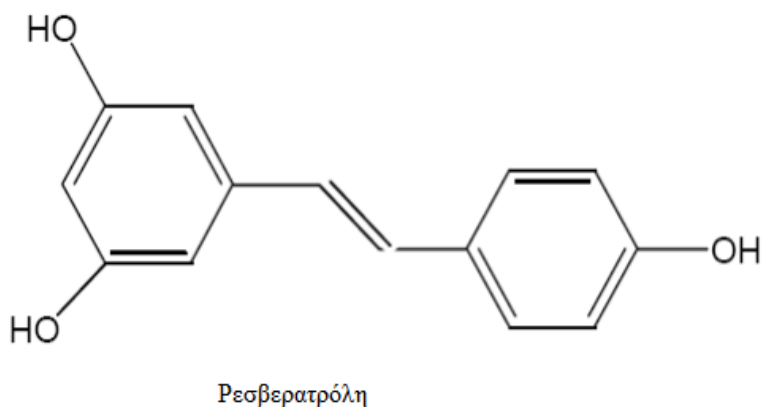
Οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί λόγω των βιολογικών δράσεων που φαίνεται να παρουσιάζουν. Τους αποδίδονται αντιπηκτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Kontogiorgis & Hatjipavlou-Litina, 2005 & Vilar et al., 2006) ενώ είναι πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αντικαρκινικοί και αντι-HIV παράγοντες (Zhang et al., 2005).

IV) Στιλβένια

Πρόκειται για μη στεροειδή οιστρογόνα τα οποία εντοπίζονται στο φυτικό βασίλειο και συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Ανάλογα με το παράγωγο του κινναμωμικού οξέος από το οποίο συντίθενται, τα στιλβένια φέρουν στο δακτύλιο Β αντίστοιχους υποκαταστάτες. Στα φυτά και στα τρόφιμα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες ως μονομερή στιλβένια, ως διμερή, τριμερή ή και πολυμερή, οι λεγόμενες βινιφερίνες (*Cassidy et al., 2000*). Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η ρεσβερατρόλη.

Η ρεσβερατρόλη έχει φανεί να ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και να αναστέλλει την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας. Επιπλέον, ως φυτοοιστρογόνο η ρεσβερατρόλη μπορεί να έχει καρδιοπροστατευτική δράση ενώ της έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (*Fremont, 2000*) καθώς και προστατευτική δράση εναντίον της οξείδωσης των αμινοξέων (*Gupta et al., 2002*).

Στην Εικόνα 1.4 παρουσιάζεται η δομή της ρεσβερατρόλης.



Εικόνα 1.4: Δομή ρεσβερατρόλης

1.2.4 Καροτενοειδή

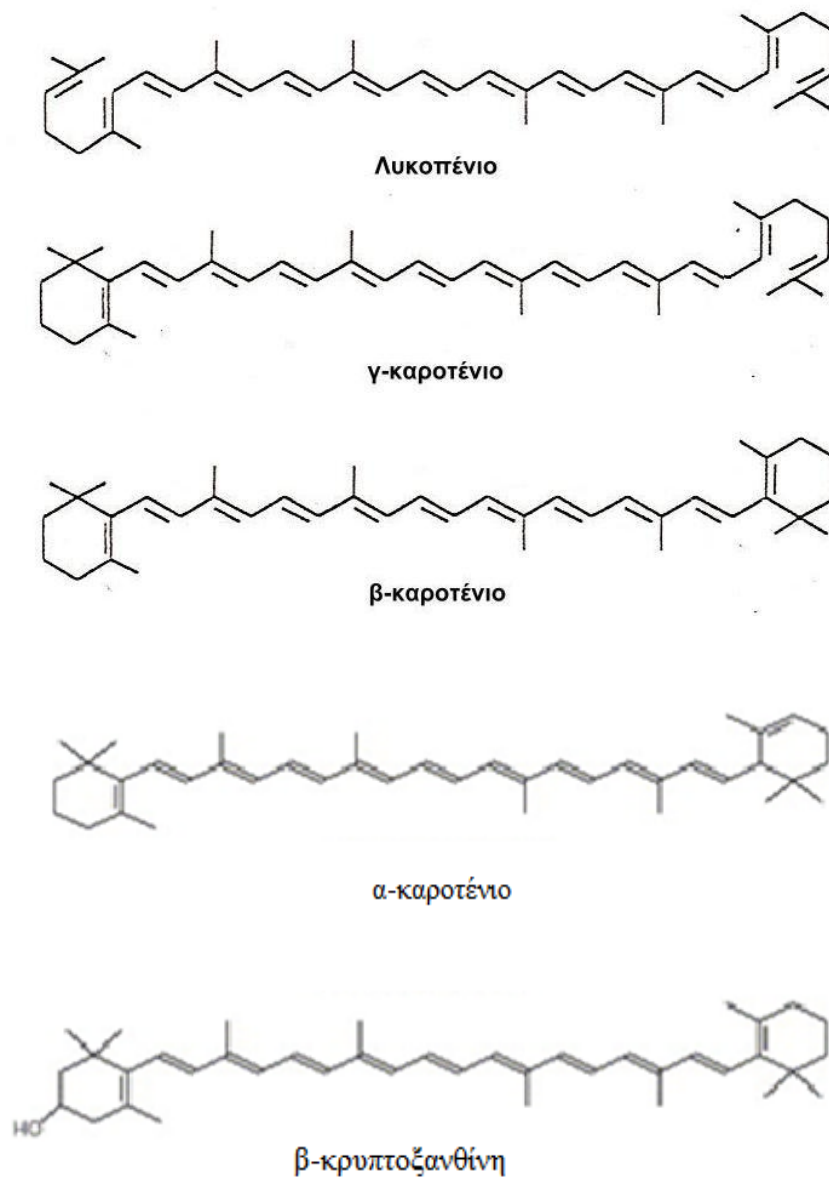
Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα φυτοχημικών που, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έχουν μελετηθεί σημαντικά λόγω της ευρείας διάδοσης τους στο φυτικό βασίλειο αλλά και λόγω των οφελών τους στην υγεία. Πρόκειται για μια ομάδα κίτρινων και πορτοκαλόχρωων λιποδιαλυτών φυσικών χρωστικών που συναντώνται στα φύλλα και σε άλλα μέρη των φυτών αλλά και σε μεγάλο αριθμό φρούτων ενώ παράγονται και από ορισμένα είδη κατώτερων οργανισμών (μικροοργανισμοί) (Eonseon et al., 2003). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 600 καροτενοειδή. Από χημική άποψη είναι είτε υδρογονάνθρακες είτε υδροξυλιωμένα παράγωγά τους και συνήθως έχουν 8 ισοπρενοειδείς ομάδες, δηλαδή 40 άτομα άνθρακα στο μόριο τους. Είναι συμμετρικά μόρια τα οποία μπορεί να είναι είτε κυκλοποιημένα, όπως το β-καροτένιο, ή μη κυκλοποιημένα, όπως το λυκοπένιο, ή και τα δύο. Μερικά μόρια αποτελούνται από μια ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα με ένα δακτύλιο στα δύο άκρα με συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, οι οποίοι αποτελούν και τη λειτουργική τους μονάδα. Η παρουσία αυτών των δεσμών έχει σαν αποτέλεσμα τα καροτενοειδή να έχουν χαρακτηριστικό σχήμα, χημική δραστηριότητα αλλά και την ικανότητα να απορροφούν το φως (Μπόσκου, 2004).

Τα καροτενοειδή που περιέχουν υδροξυλική ομάδα (οξειδωμένα παράγωγα) ονομάζονται ξανθοφύλλες, με περισσότερο χαρακτηριστική την κρυπτοξανθίνη, η οποία στη φύση μπορεί να απαντάται και σε μορφή εστέρα με λιπαρά οξέα. Άλλες κατηγορίες καροτενοειδών φέρουν το οξυγόνο σε καρβονυλική ή καρβοξυλική ομάδα, όπως η κροκετίνη. Οι συγκεκριμένες ενώσεις ενδέχεται να έχουν αριθμό ατόμων άνθρακα μικρότερο από 40 σε αντίθεση με τα άλλα καροτενοειδή (Μπόσκου, 2004).

Τα φυσικά καροτενοειδή είναι αδιάλυτα στο νερό και συνεπώς οι απώλειες σε αυτό είναι μικρές. Επιπλέον, μπορούν να υποστούν συζευγμένη αυτοοξείδωση, ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται από το σύστημα. Τα καροτενοειδή είναι περισσότερο σταθερά παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ενδεχομένως, επειδή τα λιπίδια μπορούν να δεχτούν πιο εύκολα τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, τα καροτενοειδή μπορούν να δράσουν ως προοξειδωτικά ή ως αντιοξειδωτικά. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένα καροτενοειδή, όπως το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη

παρουσιάζουν προ-βιταμινική δράση και έχουν λειτουργία ανάλογη με την προ-βιταμίνη Α (Μπόσκου, 2004) .

Οι χημικές δομές ορισμένων από τα πιο διαδεδομένα καροτενοειδή παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.5: Χαρακτηριστικές δομές καροτενοειδών.

1.2.5 Αλκαλοειδή- Τερπενοειδή

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης με ανθρακικό σκελετό ισοπρενίου $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ανοικτής αλύσου ή κυκλικό (μόνο- ή δικυκλικό). Μεγάλη ποικιλία τερπενίων περιέχονται στις ρητίνες και στα αιθέρια έλαια. Οι ρητίνες είναι μίγμα πτητικών και μη πτητικών τερπενίων ενώ τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από πτητικά, χαμηλού μοριακού βάρους τερπένια (Σαββίδης, 2000). Σύμφωνα με τον αριθμό των ισοπρενικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριό τους ταξινομούνται σε ημιτερπένια (1 ισοπρενική ομάδα), μονοτερπένια (2 ισοπρενικές ομάδες), σεσκιτερπένια (3 ισοπρενικές ομάδες), διτερπένια (4 ισοπρενικές ομάδες), τριτερπένια (6 ισοπρενικές ομάδες), τετρατερπένια (8 ισοπρενικές ομάδες), πολυτερπένια (>8 ισοπρενικές ομάδες) (Conolly & Hill, 2007). Με πολυμερισμό του ισοπρενίου σε κατάλληλες συνθήκες μπορεί να πραγματοποιηθεί χημική σύνθεση των τερπενίων. Για το λόγο αυτό τα τερπένια ονομάζονται και ισοπρενοειδή. Η βιοσύνθεσή τους απαιτεί τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος ή εναλλακτικά, την οδό φωσφογλυκεριναλδεΐδης/πυροσταφυλικού οξέος (Taiz & Zeiger, 2006).

1.2.6 Θειούχες Ενώσεις

Οι θειούχες οργανικές ενώσεις όπως οι ινδόλες, τα ισοθειοκυανικά και οι αλλυλικές θειούχες ενώσεις βοηθούν στη μείωση της φλεγμονής σε καταστάσεις όπως η αρθρίτιδα, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και η νόσος Alzheimer, στην ενίσχυση δραστηριότητας συγκεκριμένων ενζύμων που αποτοξινώνουν τον οργανισμό από τις καρκινογόνες ουσίες, στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και στην απόπτωσή τους (κυτταρικός θάνατος) και στη μείωση των επιπέδων λιπιδίων, της αρτηριακής πίεσης και της τάσης δημιουργίας θρόμβων στο αίμα. Η δράση τους είναι ιδιαίτερα σημαντική σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου και του παχέος εντέρου αναστέλλοντας τη μεταλλαξιογένεση και εμποδίζοντας τη σύνθεση των N-νιτρωδο-ενώσεων (Ahmad et al., 2010).

1.3 Βιολογική Δραστικότητα των Φυτοχημικών

1.3.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες για την κατανόηση της προστατευτικής δράσης διαφόρων βοτάνων, η οποία αποδίδεται σε ποικίλα ενεργά συστατικά αυτών όπως τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή, τα τερπένια, διάφορες ενεργές πρωτεΐνες και άλλα. Οι φαρμακευτικές δράσεις που αποδίδονται στα βότανα και σχετίζονται με τη χημική τους δομή είναι:

- Αντιοξειδωτική
- Αντιαθηρογόνος
- Αντικαρκινική
- Αντισηπτική
- Αντιφλεγμονώδης
- Αντιμικροβιακή
- Αναλγητική

1.3.2 Αντιαθηρογόνος και Αντιοξειδωτική Δράση

Η αρτηριοσκλήρυνση είναι μια κατάσταση που προσβάλλει τις μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σχεδόν κάθε ανθρώπου τουλάχιστον στις δυτικού τύπου κοινωνίες. Θεωρείται η πιο συχνή, χρόνια, πολυπαραγοντική, εκφυλιστική νόσος με ιδιαίτερα υψηλό επιπολασμό στους ηλικιωμένους ενώ το ποσοστό θανάτων από τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι μεγαλύτερο από 50% στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και τη Δυτική Ευρώπη (Damjanov, 2009) αποτελώντας την πρώτη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε αυτές τις κοινωνίες (Singh & Jialal, 2006). Πρόκειται για μια διαταραχή που ξεκινάει ήδη από την παιδική ηλικία και η οποία, απουσία επιβαρυντικών παραγόντων, εξελίσσεται αργά μέχρι τη γεροντική ηλικία οπότε είναι πολύ εκτεταμένη ως αποτέλεσμα μια φλεγμονώδους κατάστασης στο κυκλοφορικό σύστημα (Patrick & Uzick, 2001). Στη διαταραχή αυτή παρατηρούνται περιοχές ινώδους πάχυνσης του τοιχώματος των αρτηριών, που συνοδεύονται από πλάκες λιπιδίων οι οποίες ενδέχεται τελικά να ασβεστοποιηθούν. Η αρτηριοσκλήρυνση έχει ως επακόλουθο αρτηριακή ανεπάρκεια των άκρων,

διαταραχή της νεφρικής κυκλοφορίας, ανευρίσματα και, τελικά, ρήξη της αορτής ή άλλων μεγάλων αρτηριών ενώ ο σχηματισμός ενδοαγγειακών θρόμβων στην περιοχή των πλακών είναι αυτός στον οποίο αποδίδονται οι δυσμενούς προγνώσεως παθήσεις της καρδιάς και του εγκεφάλου (McPhee, 2006).

Αν και μεταξύ των επιστημόνων υπάρχουν διαφωνίες, φαίνεται ότι η αρτηριοσκλήρυνση εκκινείται ήδη από μικρή ηλικία και σχετίζεται με κάποια εντοπισμένη βλάβη στο ενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο, που αποτελεί το μεγαλύτερο αυτοκρινή αδένά του οργανισμού, είναι εκτεθειμένο σε διατμητικές τάσεις, δηλαδή τείνει να παρασυρθεί από τη ροή του αίματος ή ακόμη και να παραμορφωθεί. Υψηλές διατμητικές τάσεις ασκούνται ιδιαίτερα στα σημεία διαχωρισμού των αρτηριών και εκεί είναι που συνήθως εντοπίζεται η βλάβη του ενδοθηλίου. Σε αυτά τα σημεία βλάβης, εκφράζονται μόρια πρόσφυσης των αγγειακών κυττάρων από τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Μέσω των μορίων αυτών, τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και ακολούθως εισέρχονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή όπου μετατρέπονται σε μακροφάγα. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετατροπή ενός μονοκυττάρου σε μακροφάγο είναι η έκφραση στην επιφάνεια του μονοκυττάρου ενός εξειδικευμένου τύπου υποδοχέα των οξειδωμένων μορίων LDL καθώς το κυριότερο λιπίδιο που προσλαμβάνουν και φαγοκυτταρώνουν είναι οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Low Density Lipoproteins, LDL) και συγκεκριμένα η οξειδωμένη τους μορφή (oxLDL). Τα μακροφάγα διογκώνονται από την οξειδωμένη LDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα τότε σχηματίζουν μια λιπώδη γράμμωση κατά μήκος της αρχικά εντοπισμένης ενδοθηλιακής βλάβης. Αυτές οι γραμμώσεις είναι χαρακτηριστικές της εξελισσόμενης αρτηριοσκλήρυνσης (McPhee, 2006).

Παράλληλα, τα T-λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος απελευθερώνουν κυτταροκίνες, οι οποίες ενεργοποιούν τα μακροφάγα και αναγκάζουν τα κύτταρα των λειών μυϊκών ινών να πολλαπλασιαστούν. Αρχικά, τα κύτταρα των λειών μυϊκών ινών που βρίσκονται στην περιοχή της αρχικής βλάβης, διεγείρονται και μετακινούνται από το μέσο προς τον έσω χιτώνα και υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων, διαιρούνται, πολλαπλασιάζονται και εναποθέτουν κολλαγόνο και άλλα μόρια θεμέλιας ουσίας συμβάλλοντας στην αύξηση του όγκου της παρατηρούμενης βλάβης. Τα προαναφερθέντα κύτταρα

προσλαμβάνουν επίσης την οξειδωμένη LDL, διαδικασία που έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή και αυτών σε αφρώδη κύτταρα. Στο παραμορφωμένο αυτό και πεπαχυσμένο τοίχωμα της αρτηρίας εναποτίθεται τελικά ασβέστιο σχηματίζοντας μια εύθραυστη πλάκα, τη λεγόμενη αθηρωματική πλάκα. Οι ασβεστοποιημένες πλάκες ενδέχεται να διαρραγούν με αποτέλεσμα να αποσπαστούν μικρά κομμάτια αυτών και να σχηματίσουν έμβολα αυξάνοντας τον κίνδυνο για δημιουργία θρόμβων (*Berliner et al., 1995 & McPhee, 2006*).

Όταν οι αρτηριοσκληρυντικές πλάκες προκαλέσουν θρόμβωση και απόφραξη μιας στεφανιαίας αρτηρίας, το τμήμα του μυοκαρδίου που αιματώνεται από αυτήν νεκρώνεται (ισχαιμική νέκρωση) και εμφανίζεται το λεγόμενο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην εγκεφαλική κυκλοφορία, η απόφραξη αρτηριών στα σημεία που εντοπίζονται αρτηριοσκληρυντικές πλάκες, προκαλεί θρομβωτικά εγκεφαλικά επεισόδια ενώ εκτεταμένη αρτηριοσκλήρυνση της κοιλιακής αορτής μπορεί να προκαλέσει ανευρυσματική διάταση και ρήξη του αγγείου (*McPhee, 2006*).

Η αρτηριοσκλήρυνση αποτελεί τη βασικότερη αιτία πρόκλησης στεφανιαίας νόσου. Τα στεφανιαία αγγεία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου στα καρδιακά μυοκύτταρα και, επιπλέον, απομακρύνουν τα προϊόντα του μεταβολισμού, δηλαδή το διοξείδιο του άνθρακα, το γαλακτικό οξύ καθώς και τα ιόντα υδρογόνου. Παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης, το κάπνισμα και το οικογενειακό ιστορικό αθηροσκλήρυνσης (*McPhee, 2006*). Οι αθηρωματικές πλάκες των στεφανιαίων αρτηριών ενδέχεται να είναι (α) μαλακής υφής με υψηλό κίνδυνο να διαρραγούν γι αυτό και χαρακτηρίζονται ως «ασταθείς πλάκες» ή πλάκες υψηλού κινδύνου ή (β) σκληρής υφής οπότε και προκαλούν μόνιμη στένωση του αυλού των στεφανιαίων αρτηριών και χαρακτηρίζονται ως «σταθερές πλάκες» (*Damjanov, 2009*).

Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στη συμβολή των λιπιδίων και του μεταβολισμού αυτών στο σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών. Τα λιπίδια φυσιολογικά βρίσκονται εντός των χυλομικρών και των λιποπρωτεϊνών και προστατεύονται από την οξείδωση. Όταν, όμως, αυτά εισέρχονται στους ιστούς εκτίθενται στο οξειδωτικό στρες και υφίστανται υπεροξείδωση. Τα οξειδωμένα λιπίδια που προκύπτουν αποτελούν πηγή ελευθέρων ριζών οι οποίες προκαλούν

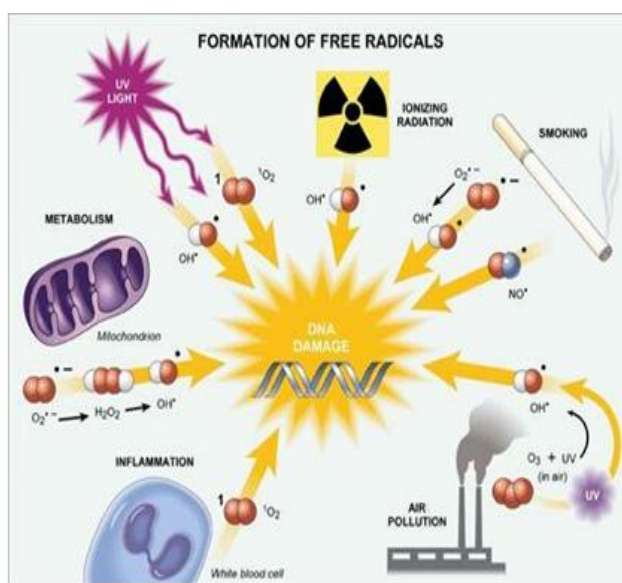
βλάβη στο ενδοθήλιο των αρτηριών ειδικά όταν η υπερλιπιδαιμία συνοδεύεται και από άλλους παράγοντες κινδύνου όπως είναι το κάπνισμα, η αρτηριακή υπέρταση και οι διαταραχές στην πήξη του αίματος που προδιαθέτουν για την ανάπτυξη θρομβώσεων. Ακολούθως αυτά προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα και με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα τα οποία συναθροίζονται στο διάμεσο ιστό, τα οποία σε συνδυασμό με τα κατεστραμμένα κύτταρα σχηματίζουν τον ημίρρεστο πυρήνα των αθηρωματικών πλακών (Damjanov, 2009).

Ειδικά για τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) είναι γνωστό ότι πρόκειται για μια από τις πέντε κύριες κατηγορίες λιποπρωτεϊνών, οι οποίες κατά σειρά μεγέθους από το μεγαλύτερο στο μικρότερο κατατάσσονται ως εξής: χυλομικρά, VLDL, IDL, LDL και HDL. Στις λιποπρωτεΐνες LDL είναι αποθηκευμένη η μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης και ο ρόλος τους είναι να μεταφέρουν τη χοληστερόλη και τους διάφορους τύπους λιπιδίων στην κυκλοφορία του αίματος. Η κύρια πηγή της LDL είναι η αποδόμηση των πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDL) καθώς η LDL έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (3-4 ημέρες) σε σχέση με τις VLDL. Κάθε μόριο της LDL αποτελείται από ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης B-100, μια πρωτεΐνη με 4526 αμινοξέα και μοριακό βάρος 516kD, η οποία μεταφέρει τα λιπαρά οξέα διατηρώντας τα διαλυτά στο υδατικό περιβάλλον. Επιπλέον, η LDL φέρει έναν πολύ υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος συνίσταται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και περίπου 1500 μόρια εστεροποιημένης χοληστερόλης. Αυτός ο πυρήνας περιβάλλεται από φωσφολιπίδια και μη εστεροποιημένα μόρια χοληστερόλης. Ο μεταβολισμός της LDL πραγματοποιείται στο ήπαρ (Segrest et al., 2001).

Η επίδραση των φυτοχημικών στην πρόληψη εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων ή στην καθυστέρηση της εξέλιξης της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, όπως έχει καταδειχθεί από επιδημιολογικές μελέτες, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων προκειμένου να διαπιστωθούν τα ακριβή συστατικά που παρουσιάζουν αυτή τη δράση (Keys, 1995 & American Dietetic Association, 1999). Όσον αφορά στα φλαβονοειδή πιστεύεται ότι η σύνδεση μεταξύ αυτών και της αθηρογένεσης βασίζεται σε αποδείξεις ότι τα φλαβονοειδή έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ότι μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση της LDL in vitro.

Επιπρόσθετα, μπορούν να αναστείλουν τη συσσώρευση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, που θεωρείται ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου τα φλαβονοειδή μειώνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ υποστηρίζεται ότι οι ισοφλαβόνες, που υπάρχουν σε προϊόντα σόγιας, έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης στο πλάσμα και να ασκούν δράση όπως τα οιστρογόνα (Howard & Kritchevsky, 1997).

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη χρόνια και οξεία υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών και την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων και αθηροσκλήρωσης καθώς οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) μεσολαβούν σε πολλά σηματοδοτικά «μονοπάτια» που αποτελούν τη βάση για την αγγειακή φλεγμονή που παρατηρείται στις καρδιαγγειακές



Εικόνα 1.6 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

παθήσεις, γεγονός που υποστηρίζεται από πολλά ζωικά μοντέλα (Singh & Jialal, 2006). Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών έγκειται στο να αποτρέπουν την υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών μέσα στο κύτταρο σε επίπεδα τέτοια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη. Τα αντιοξειδωτικά ενδέχεται να είναι ενζυμικής φύσης, όπως είναι η καταλάση, η υπεροξειδική δισμουτάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ή μη ενζυμικής φύσης, όπως είναι η γλουταθειόνη, οι θειόλες, ορισμένες βιταμίνες (π.χ. οι βιταμίνες E και C) και ιχνοστοιχεία (για παράδειγμα, το σελήνιο) και φυτοχημικά, όπως οι πολυφαινόλες (Seifried et al., 2007). Ο τρόπος σχηματισμού των ελευθέρων ριζών παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.6.

Η παρουσία ελευθέρων ριζών σε μεγάλες συγκεντρώσεις σχετίζεται με ένα μεγάλο πλήθος παθήσεων εκτός από τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως ο καρκίνος, το άσθμα, η ηπατίτιδα, η βλάβη του αμφιβληστροειδούς, η εμφάνιση καταρράκτη, οι παθήσεις του ήπατος, τα εγκεφαλικά επεισόδια, οι διάφορες δερματίτιδες, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η διπολική διαταραχή, η νόσος του Parkinson και του

Alzheimer ενώ πιστεύεται ότι συμβάλλει στην επιτάχυνση του γήρατος και γενικά στην αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Young & Woolside, 2001 & Lee et al., 2006). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί, ότι οι ελεύθερες ρίζες πέρα από την επιβλαβή τους δράση στον οργανισμό, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες και λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της απάντησης σε αυξητικούς παράγοντες, της ανοσοαπόκριση και της αποπτωτικής εξάλειψης των κατεστραμμένων κυττάρων (Seifried et al., 2007). Επιπρόσθετα, η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μικρές συγκεντρώσεις φαίνεται να συμμετέχει στην κυτταρική σηματοδότηση και να ενεργοποιεί κινάσες που έχουν μιτογόνο δράση (MAPK), οι οποίες προάγουν την αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ παράλληλα συμβάλλει στην οξειδοαναγωγική ισορροπία (Ulrich- Mezenich et al., 2009).

Γενικά, πιστεύεται ότι η εξάντληση των αντιοξειδωτικών λόγω της παρουσίας ελευθέρων ριζών συνιστά καθοριστικό παράγοντα στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης και την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Hiroi et al., 1999). Οι τρόποι μέσω των οποίων οι ελεύθερες ρίζες επάγουν την απόπτωση των κυττάρων του μυοκαρδίου περιλαμβάνουν την οξείδωση των λιπιδίων και την ενεργοποίηση της κασπάσης, των πρωτο-ογκογονιδίων και του γονιδίου p-53. Είναι γενικά αποδεκτό ότι διαφορετικές ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν διαφορετικά σηματοδοτικά «μονοπάτια» απόπτωσης των κυττάρων στο μυοκάρδιο. Στην αθηροσκλήρυνση, η παραγωγή των υπεροξειδίων μεσολαβεί για τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και τότε τα επίπεδα οξειδωμένης LDL αυξάνονται. Στο έμφραγμα του μυοκαρδίου, η εμφάνιση ισχαιμίας ή προβλημάτων στην επαναιμάτωση καθοδηγούνται από το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών καθώς η νέκρωση των μυοκυττάρων και η επακόλουθη απόπτωση είναι αποτέλεσμα της παρατηρούμενης οξείδωσης (Kaliora et al., 2005).

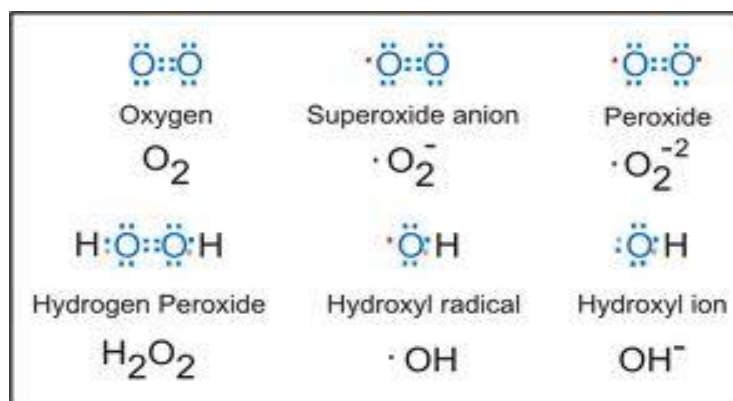
Η παρουσία ελευθέρων ριζών είναι στενά συνδεδεμένη με το οξειδωτικό στρες. Με τον όρο αυτό εννοούμε μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν (Prior & Cao, 1999 & Dryden et al., 2005). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Οι βλάβες που αφορούν στο DNA ποικίλουν και ενδέχεται να οδηγήσουν σε διάφορες μεταλλάξεις καθώς και στη δημιουργία καλοήθων και κακοήθων όγκων. Έχει αποδειχθεί ότι το οξειδωμένο γενετικό υλικό παρουσιάζει αυξημένη τάση για εμφάνιση γενετικών μεταλλάξεων αλλά και τροποποιήσεις της μεταγραφής (Kehrer, 2000). Αναφορικά με τις πρωτεΐνες, οι αλλαγές που ενδέχεται να παρατηρηθούν λόγω οξείδωσης περιλαμβάνουν τη μετουσίωση τους, διαδικασία που συνήθως οδηγεί σε παραγωγή δραστικών προϊόντων αλλά και τη δημιουργία νέων ελευθέρων ριζών που μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβη στο κύτταρο, ιδίως αν οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αντιδράσουν με ιόντα όπως είναι ο σίδηρος. Ωστόσο, φαίνεται ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να επιδιορθωθεί και, επομένως, δε συνιστά θανατηφόρο γεγονός για το κύτταρο (Stadtman & Levine, 2000). Επιπλέον, η οξείδωση τους αποτελεί και ένα είδος προστατευτικού μηχανισμού για το κύτταρο καθώς αποτρέπει την οξείδωση άλλων περισσότερο ευαίσθητων υποστρωμάτων, όπως είναι τα λιπίδια και το DNA. Τέλος, όσον αφορά στα λιπίδια, η προσβολή τους από τις ελεύθερες ρίζες οδηγεί στην υπεροξείδωσή τους και τη δημιουργία υπεροξειδικών ριζών (Sandstrom et al., 1995).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\text{-OH}^\cdot$)
- Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν ($\text{ClO}^\cdot$)
- Συνδυασμός ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\text{-O}_2^\cdot$)
- Μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.7) απεικονίζονται οι διάφορες ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS):



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση των ενεργών μορφών οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα και θεωρούνται πολύ ασταθή μόρια με μικρό χρόνο ζωής καθώς αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας τους το ηλεκτρόνιο που χρειάζονται και μετατρέποντας τα σε νέες ελεύθερες ρίζες εκκινώντας με αυτόν τον τρόπο μια αλυσιδωτή αντίδραση, η οποία διαταράσσει τη μοριακή τάξη στον οργανισμό και οδηγεί σε κυτταρική βλάβη (Salway, 2006). Τα υπεροξειδία, γενικά, θεωρούνται λιγότερο δραστικές μορφές οξυγόνου. Ωστόσο, όταν αυτά αντιδράσουν με στοιχεία μετάπτωσης ή με κινόνες είναι δυνατόν να μετατραπούν σε πιο επιθετικές μορφές, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες, και να προκαλέσουν μακροπρόθεσμη και εκτεταμένη κυτταρική βλάβη, η οποία αποδίδεται συνήθως σε προσβολή των μορίων του DNA (Lelli *et al.*, 1998).

Ενδοκυτταρικά, οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων. Κατά τη διαδικασία αυτή, παρατηρείται διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, ωστόσο, ο έλεγχος αυτής υπάγεται τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού και οι βλάβες που προκαλούνται επιδιορθώνονται συνεχώς (Kaliora *et al.*, 2006). Όταν όμως η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών αυξηθεί υπερβολικά, τότε προκαλείται κυτταρική νέκρωση, προσβάλλονται τα μόρια ATP και το κύτταρο ανίκανο να ακολουθήσει τη φυσιολογική πορεία της απόπτωσης υφίσταται λύση (Lelli *et al.*, 1998). Τότε παρατηρείται ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, τροποποίηση των πρωτεϊνών, υπεροξειδωση των λιπιδίων και διάσπαση του DNA.

Στα καρδιαγγειακά νοσήματα εντοπίζονται πολλά είδη ελευθέρων ριζών τα οποία προέρχονται τόσο από το οξυγόνο (ROS) όσο και από το άζωτο (RNS- reactive

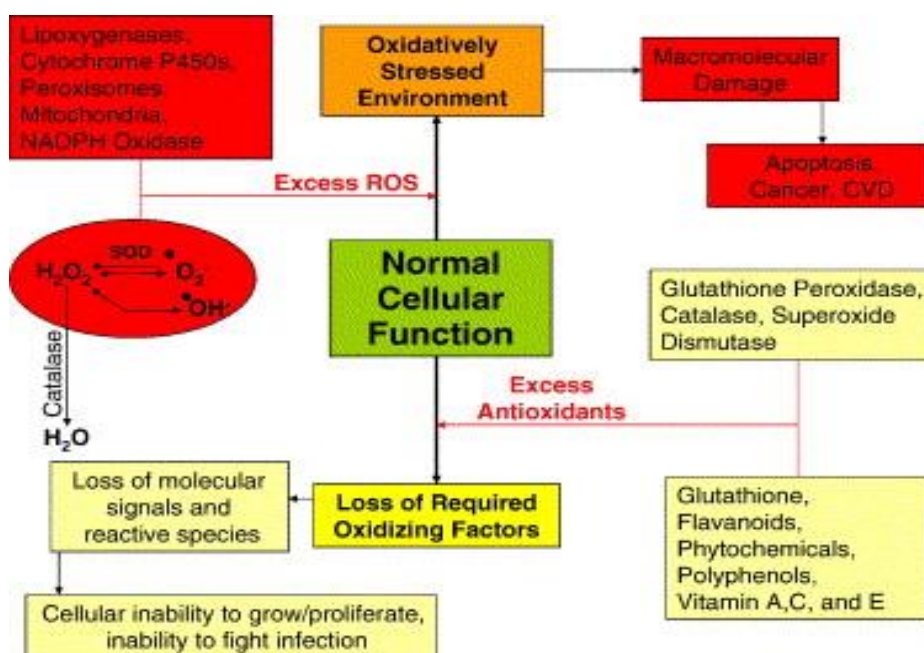
nitrogen species), οι οποίες εν μέρει παράγονται ενδογενώς από τον οργανισμό ως αποτέλεσμα φυσιοπαθολογικών μηχανισμών κάτω από ειδικές συνθήκες (Devasagayam, 2004). Έμμεσους στόχους των ελευθέρων ριζών αποτελούν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μακριάς αλύσου που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα καθώς και τα λιπίδια που υπάρχουν δεσμευμένα στην κυτταρική μεμβράνη. Αποτέλεσμα της προσβολής τους από τις ελεύθερες ρίζες είναι ο σχηματισμός λιπιδιακών υπεροξειδίων. Τα πολυακόρεστα λιπίδια που υπάρχουν στις λιποπρωτεΐνες είναι, επίσης, τρωτά από χημική άποψη από τις ελεύθερες ρίζες, όπως συμβαίνει με την οξειδωμένη LDL που περιγράφηκε παραπάνω.

Υπάρχουν, ωστόσο, και μη μιτοχονδριακές πηγές οξειδωτικού στρες και ελευθέρων ριζών, οι οποίες έχουν θεωρηθεί εξίσου σημαντικές. Τα αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης μπορούν να συγκεντρωθούν στον ιστό των αγγείων και να συμβάλλουν στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ενώ και η οξειδάση του NADPH, ο μεταβολισμός του συμπλέγματος του κυτοχρώματος P450, διάφορες φλεγμονές και η αυτοοξειδωση ορισμένων υποστρωμάτων αποτελούν, επίσης, ενδογενείς παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (Halliwell & Cross, 1994 & Houston et al., 1999 & Inoue et al., 2003). Έχει αποδειχθεί ότι προ-θεραπεία με αλλοπουρινόλη, έναν αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης, μπορεί να βελτιώσει την καρδιακή λειτουργία σε ζωικά μοντέλα (Brown et al., 1998) αλλά και σε ανθρώπους (Castelli & Condemi, 1995).

Σύνηθες φαινόμενο είναι και τα αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα των ασθενών με καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι κυτταροκίνες που παρουσιάζονται αυξημένες είναι η IL-1 β , η IL-6, ο TNF- α και η IFN- γ , οι οποίες θεωρούνται προοξειδωτικές μαζί με κάποιους αυξητικούς παράγοντες όπως ο TGF- β 1 και ο αυξητικός παράγοντας που μιμείται τη δράση της ινσουλίνης. Ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου οι κυτταροκίνες αυτές συμβάλλουν στην καρδιακή δυσλειτουργία και την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων, είναι η αυξημένη παραγωγή NO μέσω της επαγωγής ελευθέρων ριζών αζώτου. Έχει αποδειχθεί ότι το προϊόν της αντίδρασης του οξειδίου του αζώτου με το υπεροξειδικό ανιόν (ONOO $\cdot$) αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα και ο βιολογικός του δείκτης (3-νιτρο-τυροσίνη) σχετίζεται με το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, με ισχαιμικές διαταραχές και καρδιακή ανεπάρκεια (Baouersachs et al.,

1999). Αναφορικά με τον TNF- α , του έχει αποδοθεί ένας προ-αποπτωτικός ρόλος για τα κύτταρα του μυοκαρδίου. Αυξημένα επίπεδα της συγκεκριμένης κυτταροκίνης παρατηρούνται σε περιπτώσεις υποξίας, η οποία ακολουθείται από επαναιμάτωση και αναισθητοποίηση του μυοκαρδίου (Sparagna & Hickson, 1999). Αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών και δραστηριότητα των οξειδασών είναι ενδεικτικά σε χρόνιες παθολογικές καταστάσεις του καρδιαγγειακού συστήματος όπως είναι η καρδιακή ανεπάρκεια. Πιστεύεται ότι ό ίδιος ο οργανισμός ενεργοποιεί τη σύνθεση βιολογικά ενεργού TNF- α , που στη συνέχεια προάγει τις καρδιακές παθήσεις (Kaliora et al., 2006).

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται τρόπος με τον οποίο ενδέχεται να προκληθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών και ο τρόπος αντίδρασης του κυττάρου σε αυτήν την κατάσταση (Εικόνα 1.8).

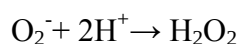


Εικόνα 1.8: Απεικόνιση του τρόπου δημιουργίας και αντιμετώπισης των ελευθέρων ριζών από το κύτταρο (Seifried et al., 2007)

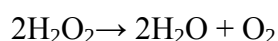
Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ελευθέρων

ρίζων. Τα κυριότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

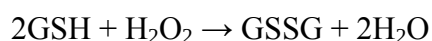
- Η **υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**, υπάρχει σε δύο μορφές και περιέχει είτε χαλκό και ψευδάργυρο (Zn/ Cu-SOD, στο κυτταρόπλασμα) είτε μαγγάνιο (Mn-SOD, στα μιτοχόνδρια). Απομακρύνει το ανιόν του υπεροξειδίου και καταλύει την αντίδραση:



- Η **καταλάση**, περιέχει σίδηρο και καταλύει την ακόλουθη αντίδραση μετατρέποντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο:



- Η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**, περιέχει σελήνιο και απομακρύνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνοντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης που εξαρτάται από το NADPH. Καταλύει την αντίδραση:



Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση S της γλουταθειόνης και οι αφυδρογονάσες των αλδεϋδών. Ως συλλέκτες ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, C και E, καθώς και διάφορα [φυτοχημικά](#), όπως οι πολυφαινόλες και τα καροτενοειδή είναι εν δυνάμει συλλέκτες ελευθέρων ριζών, θεωρείται ότι έχουν προστατευτική και θεραπευτική δράση και ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων (Mayne, 2003).

Αναφορικά με τους εξωγενείς παράγοντες που δρουν ως αντιοξειδωτικά, και ειδικότερα σχετικά με τις βιταμίνες που προαναφέρθηκαν, είναι γνωστό ότι έχουν τις ακόλουθες δράσεις:

- Βιταμίνη Α (β-καροτένια): δεσμεύει τη ρίζα υδροξυλίου και το οξυγόνο διεγερμένης κατάστασης αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων
- Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες): πρόκειται για μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία τερματίζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης και εξουδετερώνει τις λιπιδιακές ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας τα λιποπρωτεϊνικά λιπίδια του πλάσματος.
- Βιταμίνη C: εξουδετερώνει τη ρίζα της βιταμίνης Ε, αναγεννώντας τη συγκεκριμένη βιταμίνη

Η αντιοξειδωτική δράση που αποδίδεται σε ορισμένα τρόφιμα ενδέχεται να ασκείται είτε από το σύνολο των συστατικών του τροφίμου είτε από κάποια μεμονωμένα ενεργά συστατικά τους, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων. Έχει αποδειχθεί και στο παρελθόν αλλά και από πρόσφατες μελέτες, ότι άτομα που καταναλώνουν φυτικά τρόφιμα πλούσια σε πολυφαινόλες εμφανίζουν μικρότερο κίνδυνο να προσβληθούν από καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο. Η δράση αυτή εκδηλώνεται με πολλαπλούς μηχανισμούς στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων και κατά συνέπεια η ρύθμιση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και μορίων προσκόλλησης καθώς και η ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων και της αλληλουχίας των σηματοδοτικών μηνυμάτων που προσδιορίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, στην επιβίωση ή την αποπτωτική διαδικασία των κυττάρων, στην ικανότητα προσκόλλησης και την αγγειογένεση (Mitjavila & Moreno, 2012). Στα αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται, επίσης, και τρόφιμα τα οποία δεν ουδετεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες αλλά ενισχύουν τη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού, οι οποίοι όταν εκτίθενται σε παράγοντες όπως το αλκοόλ, το κάπνισμα, οι δίαιτες που είναι πλούσιες σε θερμίδες και λιπαρά, οι διάφορες μολύνσεις, οι τοξίνες, η ακτινοβολία (η ιονίζουσα ακτινοβολία αντιδρά με μόρια νερού στους ιστούς), η έντονη φυσική δραστηριότητα (παρέχεται αυξημένη ποσότητα οξυγόνου στους μύες) και οι

τραυματισμοί αποδυναμώνονται και αδυνατούν να αντισταθμίσουν το οξειδωτικό στρες (*Kaliora et al., 2006*).

Για να μπορεί μια ουσία να θεωρηθεί αντιοξειδωτικό πρέπει να φέρει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα ώστε να είναι εφικτό να δράσει στην περιοχή αυτή και να ανταγωνιστεί με το υπόστρωμα για τη δέσμευση του οξειδωτικού παράγοντα (*Bravo, 1998*).
- Να έχει την ικανότητα να καθυστερήσει ή να αποσβέσει την οξείδωση, όταν είναι παρούσα σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με το προς οξείδωση υπόστρωμα (*Vinson, 1999*).
- Να έχει την ικανότητα να δίνει ως προϊόν της αντίδρασης με την ελεύθερη ρίζα που δεσμεύει, ένωση σταθερή σε περαιτέρω οξείδωση (*Vinson, 1999*).

Προκειμένου μια αντιοξειδωτική ουσία να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε τρόφιμα χρειάζεται να φέρει και κάποιες περαιτέρω ιδιότητες, οι οποίες είναι (*Μπόσκου, 1997*) :

- Να μην είναι βλαβερό για την υγεία του ανθρώπου.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό.
- Να είναι όσο το δυνατόν πιο σταθερό κατά τη διαδικασία επεξεργασίας του τροφίμου, προκειμένου να μην παρατηρείται απώλεια της ευεργετικής του δράσης.
- Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση (αφορά κυρίως στα συνθετικά αντιοξειδωτικά που προστίθενται στα τρόφιμα από τις βιομηχανίες τροφίμων).

Επιπρόσθετα, τα αντιοξειδωτικά των τροφίμων διακρίνονται σε κύρια και δευτερεύοντα. Ως κύρια χαρακτηρίζονται τα αντιοξειδωτικά που έχουν την ικανότητα να τερματίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες παρέχοντας άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερών και αδρανών προϊόντων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα ΒΗΑ

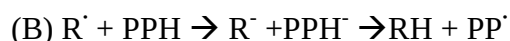
(βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), TBHQ (tert- βούτυλο-υδροκινόνη), PG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), οι φαινόλες, οι τοκοφερόλες, το καφεϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και άλλα. Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου, δηλαδή να αντιδρούν με το οξυγόνο και να ελαττώνουν τη συγκέντρωσή του σε ένα κλειστό σύστημα. Εδώ ανήκουν το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του, το θειώδες οξύ και τα άλατα αυτού αλλά και τα καροτενοειδή (*Frankel, 1998*).

Η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες (και ειδικότερα τα φλαβονοειδή) σχετίζεται με τη χημική τους δομή και αποδίδεται στην ικανότητά τους (*Rice- Evans et al., 1996 & Williamson & Manach, 2005 & Rodrigo et al., 2011*):

- Να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες
- Να είναι δότες ηλεκτρονίων
- Να είναι δότες ατόμων υδρογόνου
- Να προστατεύουν ενδογενή αντιοξειδωτικά του οργανισμού, όπως είναι η βιταμίνη E, το λυκοπένιο και το β-καροτένιο
- Να σχηματίζουν χημικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα (όπως είναι ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο και το κοβάλτιο) προκειμένου να αποτρέψουν την αντίδραση αυτών με ελεύθερες ρίζες ή άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου (για παράδειγμα, H_2O_2) καθώς έχουν την ικανότητα να δρουν ως οξειδοαναγωγικοί παράγοντες, προσφέροντας ή προσλαμβάνοντας ηλεκτρόνια (*Amarowicz et al., 2004*)
- Να επάγουν τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (*Xiuzhen et al., 2007 & Rodrigo et al., 2011*)
- Να αναστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων (*Park & Pezzuto, 2002 & Rodrigo et al., 2011*).

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση λειτουργώντας ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης που επάγει η

οξειδωση των ελευθέρων ριζών, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στη συγκεκριμένη περιοχή. Ο μηχανισμός δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες πραγματοποιείται με δύο τρόπους: είτε μέσω μιας άμεσης διαδικασίας μεταφοράς υδρογόνου (Α), είτε μέσω μιας συζευγμένης μεταφοράς πρωτονίου και ηλεκτρονίου (Β), όπως φαίνεται παρακάτω.



Όπου:

PPH = πολυφαινόλες

$R^{\bullet}$ = δραστική ελεύθερη ρίζα [υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet-}$), υδροξυλική ρίζα ($OH^{\bullet}$)]
(Robards et al., 1999)

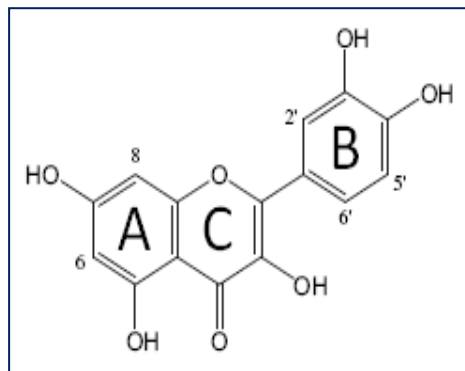
$PP^{\bullet}$ = φαινόξυ-ρίζα, ελεύθερη ρίζα πολυφαινόλης

Όσον αφορά τον ενδιάμεσο μεταβολίτη, πρόκειται για ένα πολύ σταθερό και σχετικά αδρανές μόριο που δεν επιτρέπει την έναρξη μιας νέας αλυσιδωτής αντίδρασης μετά την προσβολή του από O_2 ενώ έχει την ικανότητα να αντιδρά και με άλλες ελεύθερες ρίζες, δίνοντας και πάλι ως προϊόν σταθερά μόρια.

Έχει αποδειχθεί, ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών είναι στενά συνδεδεμένη με τη χημική τους δομή. Ειδικότερα, η ικανότητα των φαινολικών οξέων να δρουν ως αντιοξειδωτικά εξαρτάται τόσο από τον αριθμό όσο και από τη θέση των ομάδων υδροξυλίου που φέρουν στο μόριο τους σε σχέση με τη δραστική ομάδα καρβοξυλίου (Rice- Evans et al., 1999 & Robards et al., 1999). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης. Αντίθετα, όταν οι υδροξυλικές ομάδες στην 3- και 5- θέση αντικατασταθούν με μεθοξυ-ομάδες, η ικανότητα τους αυτή μειώνεται (συριγγικό οξύ) (Rice-Evans et al., 1996). Επιπρόσθετα, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα συγκριτικά με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (Andreasen et al., 2001). Η υψηλότερη δραστηριότητα των υδροξυκιναμωμικών οξέων είναι πιθανό να οφείλεται στην προπενοϊκή αλυσίδα ($CH=CH-COOH$) η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα ως δότης υδρογόνου

και καλύτερη σταθερότητα στο συντονισμό συγκριτικά με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) των υδροξυβενζοϊκών οξέων (Rice-Evans *et al.*, 1996). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η θέση των υποκαταστατών σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) και η απόσταση τους από τον αρωματικό δακτύλιο είναι μια παράμετρος που επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων.

Η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση και των υπόλοιπων υποομάδων των πολυφαινολών, όπως τα φλαβονοειδή (Εικόνα 1.9). Η ένωση που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η κερκετίνη, η οποία ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών. Η κερκετίνη εμφανίζει έντονη



Εικόνα 1.9 Δομή Φλαβονοειδών

αντιοξειδωτική δράση, γεγονός που αποδίδεται στα παρακάτω χαρακτηριστικά της : i) στην ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων στον Β δακτύλιο, ii) στην παρουσία του ο- διφαινολικού τμήματος στον Β δακτύλιο, ο οποίος είναι ικανός να λειτουργήσει ως δότης Η για να σταθεροποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες και iii) στις ομάδες -OH στις θέσεις 3 και 5, που αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Άλλες ενώσεις που δρουν ως αντιοξειδωτικά λόγω συναφών χαρακτηριστικών με την κερκετίνη είναι η υδροξυτυροσόλη, η κατεχίνη, η κυανιδίνη και η μυρισετίνη, (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Έχει αποδειχθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών μειώνεται κατά τη σειρά:

Κερκετίνη > μυρισετίνη > καμπερόλη και γενικότερα:

Προκυανιδίνες > φλαβανόλες > φλαβονόλες > υδροξυ-κινναμωμικά οξέα > απλά φαινολικά οξέα

ενώ το γαλλικό και το ροσμαρινικό οξύ έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μεταξύ φαινολικών οξέων και υδροξυ-κινναμωμικών οξέων (Soobrattee *et al.*, 2005).

Ακόμη, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες επηρεάζεται από την παρουσία σακχάρου στο μόριο τους και συγκεκριμένα μειώνεται όταν υπάρχει κάποιο σάκχαρο συνδεδεμένο ενώ σημαντική είναι και η θέση σύνδεσης. Οι γλυκοζίτες των πολυφαινολών συνήθως δεν είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, παρά το γεγονός ότι τα αντίστοιχα ελεύθερα μόρια αυτών έχουν την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, και οι συζευγμένες με σάκχαρα πολυφαινόλες μπορούν να συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις και να δεσμεύουν ενεργά μόρια οξυγόνου ή αζώτου, η ικανότητα τους όμως είναι κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες μορφές τους (*Williams et al., 2004*).

Όπως προκύπτει, η δράση των ελευθέρων ριζών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στα καρδιαγγειακά νοσήματα όσο και σε άλλες χρόνιες εκφυλιστικές νόσους. Έχει αναφερθεί ότι η παρατηρούμενη ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών μπορεί να οφείλεται είτε σε μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής, είτε σε μειωμένη σύνθεση των ενζύμων που αναστέλλουν την οξείδωση από τον οργανισμό, είτε σε αυξημένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών που παρουσιάζουν προ-οξειδωτική δράση (*Kelly, 1998*). Για το λόγο αυτό, συστήνεται επαρκής πρόσληψη των απαραίτητων μικροσυστατικών, ιχνοστοιχείων και φυτοχημικών μέσω της διατροφής προκειμένου να εξασφαλίζονται/παρέχονται στον οργανισμό ουσίες που είναι απαραίτητες και ενισχύουν την άμυνα του έναντι της οξείδωσης.

1.3.3 Αντιφλεγμονώδης Δράση

Ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα του 20^{ου} αιώνα ήταν η ανακάλυψη της πενικιλίνης και η χρήση αυτής ως αντιβιοτικού. Στο πέραςμα του χρόνου παρασκευάστηκαν και άλλα αντιβιοτικά προκειμένου να καταπολεμηθούν διάφορες μολυσματικές ασθένειες από βακτήρια, μύκητες και ιούς. Ωστόσο, πριν την εμφάνιση αυτών των ουσιών, ο μόνος τρόπος που υπήρχε για την αντιμετώπιση τέτοιων μολύνσεων ήταν η χρήση των βοτάνων (*Rickard et al., 2004*).

Σχετικά με το μηχανισμό της φλεγμονής είναι διαθέσιμα πολλά στοιχεία καθώς έχει μελετηθεί εκτενώς. Ειδικότερα, η φλεγμονή είναι μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία του οργανισμού ως απάντηση στον ιστικό τραυματισμό, στη

μόλυνση από μικροβιακά παθογόνα και στο χημικό ερεθισμό. Σε μια περιοχή που έχει υποστεί βλάβη, η φλεγμονή εκκινείται με τη μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος από τα αιμοφόρα αγγεία και την απελευθέρωση μεσολαβητών η οποία ακολουθείται από πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων και απελευθέρωση ενεργών/δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου καθώς και προφλεγμονωδών κυτταροκινών με σκοπό την εξάλειψη των διαφόρων παθογόνων, την εξάλειψη της μόλυνσης και την επιδιόρθωση των τραυματισμένων ιστών (*Pan et al., 2009 & Medzhitov, 2008*). Γι αυτό το λόγο, ο κύριος μηχανισμός της φλεγμονής έχει ευεργετική επίδραση στην άμυνα του ξενιστή.

Γενικά, η φυσιολογική φλεγμονή είναι ταχεία και αυτό-περιοριζόμενη όμως η παρεκκλίνουσα και παρατεταμένη φλεγμονή είναι πιθανό να οδηγήσει σε σοβαρές χρόνιες διαταραχές στην υγεία. Η χρόνια φλεγμονή ενδέχεται να προκαλέσει σοβαρότερη βλάβη σε κάποιον από τους ιστούς του ξενιστή απ' ό, τι μπορεί να προκαλέσει η μόλυνση από κάποιο βακτήριο. Ποικίλες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS), όπως είναι το ανιόν του υπεροξειδίου, η ρίζα υδροξυλίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οξείδιο του αζώτου και το μονήρες οξυγόνο, που παράγονται/δημιουργούνται από τα φλεγμονώδη κύτταρα μπορούν να βλάψουν διάφορα βιομόρια συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια προκαλώντας κυτταρικό και ιστικό τραυματισμό που με τη σειρά τους ενισχύουν την κατάσταση της φλεγμονής (*Libby, 2007*). Οι χημικές ουσίες που απελευθερώνονται λόγω της φλεγμονής επιτίθενται και σε φυσιολογικούς ιστούς που περιβάλλουν τη μολυσμένη περιοχή προκαλώντας οξειδωτική βλάβη και εκτεταμένη ιστική φλεγμονή.

Εκτός από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως αντιφλεγμονώδη (για παράδειγμα, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, NSAIDs), τα τελευταία χρόνια αποδεικνύονται δραστικά συστατικά που υπάρχουν φυσικά στα τρόφιμα και τα φυτά. Για παράδειγμα, η ρεσβερατρόλη και η κουρκουμίνη έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν τα κύτταρα από την καταστροφή και το θάνατο μέσω των αντιοξειδωτικών δράσεων που εμφανίζουν ενώ έχει αποκαλυφθεί και η νευροπροστατευτική δράση των συστατικών αυτών (*Vingtdeux et al., 2008 & Ray et al., 2009*). Λόγω αυτών των δράσεων τους ως αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη, τα φυτοχημικά μπορούν να θεωρηθούν ότι συμβάλλουν στην πρόληψη ή και τη

θεραπεία διαφόρων χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων, ωστόσο, χρειάζονται ακόμα να γίνουν αρκετές έρευνες για να τεκμηριωθεί ο ακριβής τρόπος δράσης τους.

1.3.4 Άλλες Δράσεις

Αντικαρκινική Δράση

Ο καρκίνος είναι η πάθηση που θεωρείται ως δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως (*Jemal et al., 2008 & Kluhnaprema & Strivatanakul, 2008*). Σύμφωνα με στατιστικές, περίπου δέκα εκατομμύρια άνθρωποι ετησίως διαγιγνώσκονται ότι πάσχουν από καρκίνο σε όλον τον κόσμο και περίπου 6.2 εκατομμύρια καταλήγουν από αυτή την ασθένεια (*Das et al., 2007, Jemal et al., 2008*). Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται διαρκώς απορροφώντας από τον οργανισμό τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται και δημιουργούν μάζες κυττάρων που συνιστούν τους όγκους. Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να είναι καλοήγη ή κακοήγη (*Ζαμπέλας, 2007*).

Τα αίτια στα οποία αποδίδεται η εμφάνιση του καρκίνου μπορεί να σχετίζονται με το γενετικό υπόβαθρο ή με περιβαλλοντικούς παράγοντες ή με συνδυασμό αυτών. Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να αφορούν σε αλλαγές στον τρόπο λειτουργίας γονιδίων όπως τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ή και σε αδρανοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν αρνητικά είναι διάφορες μορφές ακτινοβολίας όπως η υπεριώδης και η γ-ακτινοβολία, χημικές ουσίες με μεταλλαξιογόνο δράση όπως η φορμαλδεΰδη, ορισμένες χρωστικές, κάποιοι αρωματικοί κυκλικοί υδρογονάνθρακες, το κάπνισμα και η διατροφή. Επιπλέον, ορισμένοι τύποι καρκίνου ενδέχεται να οφείλονται στην ύπαρξη οξειδωτικού στρες και στην παρουσία ελευθέρων ριζών που προκαλούν βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια (*Huang et al., 2010*).

Τα τελευταία χρόνια, πολλοί καρκινοπαθείς ασθενείς στρέφονται σε εναλλακτικές μορφές θεραπείας για ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, όπως η βοτανοθεραπεία, ο βελονισμός και διάφορα πολυβιταμινούχα σκευάσματα,

συνδυαστικά με τη φαρμακευτική αγωγή που ακολουθούν, προκειμένου να ενισχύσουν τον οργανισμό τους και να βελτιώσουν την υγεία τους. Όπως προκύπτει από στατιστικά δεδομένα, η χρήση των εναλλακτικών μορφών θεραπείας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ηλικία των ατόμων, δηλαδή τα άτομα νεαρής ηλικίας τείνουν να τις χρησιμοποιούν περισσότερο σε σχέση με τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Από τα ίδια στατιστικά δεδομένα προκύπτει ότι οι γυναίκες είναι πιθανότερο να καταφεύγουν σε τέτοιου τύπου θεραπείες συγκριτικά με τους άνδρες (*Mansky et al., 2006*).

Η χρήση των βοτάνων σε ό, τι αφορά τη συγκεκριμένη νόσο έχει μελετηθεί αρκετά καθώς είναι γνωστό ότι περιέχουν ειδικά χημικά συστατικά, τα λεγόμενα φυτοχημικά που αναφέρονται στην παράγραφο 1.2, τα οποία ασκούν ευεργετική δράση και χρησιμοποιούνται ως χημειοπροστατευτικά. Επιπλέον, η σχέση μεταξύ φλεγμονής και καρκίνου έχει πλέον τεκμηριωθεί (*Coussens et al., 2002 & Mantovani et al., 2009*). Πολυάριθμες έρευνες υποστηρίζουν ότι τα μονοπάτια που ακολουθούνται στη διαδικασία της φλεγμονής αποτελούν κρίσιμους στόχους για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου (*Aggarwal et al., 2009*). Συστατικά που έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση του καρκίνου, λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας, είναι τα φλαβονοειδή, οι προανθοκυανιδίνες καθώς και άλλα πολυφαινολικά συστατικά όπως τα τερπενοειδή (*Pan & Ho, 2008*). Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι έχουν ευεργετική δράση εναντίον του καρκίνου καθώς αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και συμβάλλουν στη θνησιμότητα αυτών συνδυαστικά με τη χημειοθεραπεία. Τα απαραίτητα έλαια από ευρέως χρησιμοποιούμενα βότανα συμμετέχουν στην αναστολή της σύνθεσης του μεβαλονικού οξέος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (*Eng et al., 2001*) και έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τις φάσεις I και II του μεταβολισμού συμβάλλοντας στην εξάλειψη της καρκινογένεσης από το σώμα (*Wargovich et al., 2001*). Επιπλέον, το λυκοπένιο, ένα από τα καροτενοειδή, συμβάλλει στην «εκκαθάριση» των ελευθέρων ριζών από τον οργανισμό ενώ από έρευνες έχει φανεί ότι βοηθάει και στην προστασία από συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (*Bucci et al., 2000*).

Στην πρόληψη του καρκίνου έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν και άλλα φυτοχημικά που υπάρχουν στο σκόρδο, το πράσινο τσάι, το ginseng καθώς και σε διάφορα μπαχαρικά ενώ στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου έχει

αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικά αποτελέσματα συστατικά από το Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*), τη λεβάντα και το λυκίσκο. Συγκεκριμένα, για το πράσινο τσάι έχει αποδειχθεί από πληθυσμιακές μελέτες ότι η τακτική κατανάλωσή του οδηγεί σε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου γεγονός που αποδίδεται στην παρουσία φλαβονοειδών που έχουν αντιοξειδωτική χημειοπροστατευτική δράση στο ζεστό εκχύλισμά του και ειδικότερα στις 3-φλαβανόλες που αυτό περιέχει (Kinjo *et al.*, 2002). Επιπλέον, έχει φανεί ότι τα μονοτερπένια που περιέχονται σε διάφορα φρούτα και βότανα (όπως η γερανιόλη που αναστέλλει την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου), συμβάλλουν στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων μέσω της μείωσης του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των πολυαμινών, η δραστηριότητα των οποίων ενισχύεται κατά την καρκινογένεση. Παράλληλα, ένα ακόμα ευεργετικό αποτέλεσμα είναι ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό των πολυαμινών επιδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τη χημειοπροστατευτική τους δράση (Abdullaev *et al.*, 2002). Ακόμη, το διάλλυλοσουλφίδιο που αποτελεί συστατικό του σκόρδου φάνηκε να ασκεί χημειοπροστατευτική δράση σε περιπτώσεις καρκίνου στον πνεύμονα, στο κόλον και στο ήπαρ. Τέλος, η ρεσβερατρόλη που εντοπίζεται στο κόκκινο κρασί, εμποδίζει την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος όπως αποδείχθηκε από έρευνες σε επίμυες που είχε προκληθεί καρκίνωμα (Wargovich *et al.*, 2001) ενώ η κουρκουμίνη φάνηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στο παχύ έντερο (Reddy *et al.*, 2006).

Κάθε μορφή καρκίνου εκτός από διαφορετική εντόπιση εμφανίζει και διαφορετικά συμπτώματα και διαφορετική σοβαρότητα. Συνεπώς, τόσο η φαρμακευτική αγωγή όσο και οι μορφές θεραπείας που χρησιμοποιούνται επιβάλλεται να είναι εξειδικευμένες προκειμένου να επιτυγχάνεται σωστή αντιμετώπιση της νόσου.

Δράσεις των Βοτάνων σε Γαστρεντερικές Διαταραχές

Οι γαστρεντερικές διαταραχές είναι πολύ συχνές στο γενικό πληθυσμό και οι συνήθεις θεραπείες που χρησιμοποιούνται είναι τα αντιόξινα φάρμακα και οι αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (αναστέλλουν την έκκριση των ιόντων H⁺ στο στόμαχο). Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η βοτανοθεραπεία προκειμένου

να ανακουφιστούν τα συμπτώματα των διαταραχών αυτών. Η βοτανοθεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος, όπως η δυσπεψία και το αίσθημα καύσου στο στομάχο, το γαστρικό έλκος, η προσβολή από το βακτήριο *Helicobacter pylori*, η ναυτία και ο έμετος, οι ηπατικές παθήσεις καθώς και άλλες διαταραχές του γαστρεντερικού σωλήνα.

Ενεργά συστατικά που ασκούν ευεργετική επίδραση στις παθήσεις του γαστρεντερικού έχει αποδειχθεί ότι είναι η απιγενίνη, η φαρνεσόλη, το ροσμαρινικό οξύ, η κουμαρίνη καθώς και κάποια αλκαλοειδή (O'Hara *et al.*, 1998 & Abebe, 2002 & Al-Achi, 2005). Παρά την εκτεταμένη χρήση των βοτάνων για παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος, η παρακολούθηση των ιδιαίτερων συμπτωμάτων κάθε ασθενούς είναι αυτή που θα καθορίσει την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή ή το συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής και βοτανοθεραπείας ή μόνο τη σύσταση για βοτανοθεραπεία πάντα υπό την παρακολούθηση ειδικών.

Αντιβακτηριακή/ Αντικκή Δράση των Βοτάνων

Έχει φανεί ότι η αποτελεσματικότητα των αντιβακτηριακών παραγόντων από διάφορα βότανα αφορά κυρίως στις μολύνσεις από τα Gram (+) βακτήρια. Αυτή η διάκριση σχετίζεται με την ικανότητα των μικροοργανισμών αυτών να σημειθούν με ειδικές χρωστικές ουσίες, ιδιότητα που έχει να κάνει με την ευαισθησία που τους διακρίνει. Τα Gram (-) βακτήρια φέρουν ένα εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα μέσω το οποίου εμποδίζουν εξωγενείς ουσίες να εισέλθουν στο κύτταρο γι αυτό και τα συστατικά βοτάνων μπορούν να έχουν κάποιο ευεργετικό αποτέλεσμα εναντίον αυτών μόνο όταν εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα σε μορφή ουσιών (όπως η ρεσβερατρόλη από το κόκκινο κρασί) που μπορούν να διαπεράσουν/ απενεργοποιήσουν τον ειδικό μηχανισμό αυτών των κυττάρων μέσω του οποίου κρατούν το κύτταρο ανέπαφο (Huiying *et al.*, 2003).

Τα τροφογενή παθογόνα αποτελούν τη βασικότερη πηγή για τροφικές δηλητηριάσεις και μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες ακόμα και στο θάνατο. Παραδείγματα τέτοιων τροφογενών παθογόνων είναι: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella anatum* και *Plasmodium falciparum*. Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι η αντιβακτηριακή

δράση από βότανα και καρυκεύματα εναντίον τέτοιων παθογόνων είναι ανάλογη με το φαινολικό τους περιεχόμενο, δηλαδή, όσο μεγαλύτερο είναι το φαινολικό περιεχόμενο σε αυτά τόσο ισχυρότερη είναι η αντιβακτηριακή τους δράση. Στα συστατικά που εμφανίζουν ισχυρή δράση ανήκουν η καρβακρόλη (ανευρίσκεται στα πτητικά έλαια βοτάνων και καρυκευμάτων και έχει χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις δηλητηρίασης από *Escherichia coli*) και τα σεσκιτερπένια (ανθελονοσιακή δράση) (Bagamboula et al., 2001 & Shan et al., 2007). Το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*) θεωρείται, επίσης, ότι έχει σημαντική αντιβακτηριακή δράση.

Στα βότανα που παρουσιάζουν αντιική/ ιοκτόνο δράση συμπεριλαμβάνονται το Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*) του οποίου η δράση αποδίδεται στην υπερικίνη καθώς και το Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), το φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*), η μέντα (*Mentha piperita*) και το σανδαλόξυλο (*Santalum album*), τα οποία επιδεικνύουν δράση εναντίον των δύο τύπων του ιού του απλού έρπητα (HSV-1 και HSV-2) όταν βρίσκονται σε μορφή εκχυλίσματος. Η ύπαρξη των φλαβονοειδών που περιέχονται στα εκχυλίσματα από τα παραπάνω βότανα και ειδικότερα της κερκετίνης και της απιγενίνης φάνηκε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα εναντίον του ιού και, μάλιστα, αποδείχθηκε ότι ασκούν συνεργιστική δράση με τα αντιικά φάρμακα όταν αυτά συγχωρηγούνται (Mucsi, 1992).

Μια ακόμη μολυσματική νόσος που εντοπίζεται παγκοσμίως και έχει μεγάλα ποσοστά θνητότητας είναι η μόλυνση από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Οι ασθενείς που πάσχουν από αυτή τη νόσο συχνά καταφεύγουν στη χρήση εναλλακτικών μορφών θεραπείας, και συγκεκριμένα, βοτανοθεραπείας, συνδυαστικά με τη φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν προκειμένου να ανακουφίσουν τα συμπτώματα της νόσου. Από τα πιο διαδεδομένα βότανα που λαμβάνουν τα άτομα αυτά είναι η Echinacea (για ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος) , το Ginkgo biloba (για αντιοξειδωτική δράση) καθώς και το Σπαθόχορτο (για αντιική δράση). Ωστόσο, είναι συχνό φαινόμενο η αλληλεπίδραση μεταξύ της βοτανοθεραπείας και της φαρμακευτικής αγωγής που συστήνεται για τη νόσο του AIDS καθώς τα βότανα αυτά μειώνουν τη συγκέντρωση των αντιικών φαρμάκων λόγω διέγερσης των ενζύμων του ήπατος στο οποίο πραγματοποιείται ο μεταβολισμός των φαρμάκων. Γι αυτό οι ασθενείς πρέπει να συμβουλευούνται το θεράποντα ιατρό προηγούμενα της

χρήσης οποιασδήποτε μορφής εναλλακτικής θεραπείας (Van den Bout-van den Beukel, 2006 & Liu et al., 2005).

Δράσεις των Βοτάνων για Δερματικές Παθήσεις

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο στο ανθρώπινο σώμα και το προστατεύει από την αφυδάτωση εμποδίζοντας τη διαφυγή της υγρασίας παρά μόνο μέσω των ιδρωτοποιών αδένων. Το εξωτερικό στρώμα του δέρματος αποτελείται από νεκρά, επίπεδα κύτταρα τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη κερατίνη, η παρουσία της οποίας θεωρείται υπεύθυνη για την ελεγχόμενη ανταλλαγή υγρασίας του σώματος με το περιβάλλον.

Αποτελεί συχνό φαινόμενο οι ασθενείς που πάσχουν από δερματικές παθήσεις να καταφεύγουν στην αναζήτηση εναλλακτικών μορφών θεραπείας (Ernst et al., 2002). Δερματικές παθήσεις για τις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί θεραπεία με βότανα είναι η ακμή, οι τραυματισμοί και τα εγκαύματα περιορισμένης έκτασης και ο ιός του απλού έρπητος. Φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως για τέτοιες περιπτώσεις είναι μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*), μέντα (*Mentha piperita*), δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), φασκόμηλο (*Salvia officinalis*), θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και άλλα (Dimitrova et al., 1993 & Koytchev et al., 1999 & Allahverdiyev et al., 2004).

Παρά το πλήθος ερευνών που αποδεικνύουν τα ευεργετικά αποτελέσματα στο χειρισμό των δερματικών παθήσεων, συστήνεται η συμβουλή ειδικού δερματολόγου πριν τη χρήση οποιουδήποτε σκευάσματος που περιέχει κάποιο από τα θεραπευτικά βότανα που προαναφέρθηκαν προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές παρενέργειες καθώς κάθε περίπτωση είναι διαφορετική.

Δράσεις των Βοτάνων σε Ψυχιατρικά Νοσήματα

Τον τελευταίο καιρό όλο και περισσότεροι ασθενείς με παθήσεις του νευρικού συστήματος καταφεύγουν στην αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης του προβλήματος τους (White, 2009). Εξέχουσα θέση σε αυτές τις εναλλακτικές

θεραπείες κατέχουν τα βότανα λόγω των ιδιοτήτων τους ως αγχολυτικά, τονωτικά, αντικαταθλιπτικά αλλά και άλλων δράσεων τους. Ειδικότερα, έχει μελετηθεί η επίδραση των βοτάνων σε παθήσεις του νευρικού συστήματος όπως είναι, η άνοια, η κατάθλιψη, το χρόνιο στρες και η αϋπνία.

Στα φαρμακευτικά φυτά που έχουν μελετηθεί λόγω της ευεργετικής τους δράσεις σε τέτοιου είδους παθήσεις συμπεριλαμβάνονται το Σπαθόχορτο (*Hypericum perforatum*), ο λυκίσκος (*Humulus lupulus*), η βαλεριάνα (*Valeriana officinalis*), το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*) καθώς και το χαμομήλι (*Matricaria recutita*) (Ernst, 2002 & Hodges & Kam, 2002). Ενεργά συστατικά που έχουν βρεθεί στα προαναφερθέντα βότανα είναι τα φλαβονοειδή κερκετίνη και καμπερόλη, διάφορα τερπενοειδή (μονοτερπένια και σесκιτερπένια) και οργανικά οξέα (O'Hara et al., 1998 & Dhawan et al., 2001 & Pittler & Ernst, 2003), η υπερφορίνη και η υπερικίνη (Muller et al., 1997 & Geier & Konstantinowicz , 2004) καθώς και η κουμαρίνη, η φαρνεσόλη καθώς και η απιγενίνη (O'Hara et al., 1998 & Hodges & Kam, 2002).

1.4 Ελληνικά Φαρμακευτικά Φυτά

Η Ελλάδα είναι μια χώρα που χαρακτηρίζεται από πλούσια χλωρίδα γι αυτό και το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων που ασχολούνται με τις ωφέλειες των φαρμακευτικών φυτών έχει στραφεί προς της ιδιότητες της. Ωστόσο, τα διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες που έχουν γίνει in vitro και in vivo είναι ακόμα λίγα και είναι σημαντικό να γίνει περαιτέρω έρευνα. Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση βοτάνων της ελληνικής μικροχλωρίδας. Στην ενότητα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά και η σύσταση των βοτάνων που μελετήθηκαν (με αλφαβητική σειρά).

Τα βότανα που μελετήθηκαν ανήκουν στην πλειοψηφία τους στην οικογένεια των Lamiaceae με εξαίρεση το Σπαθόχορτο που ανήκει στην οικογένεια των Clusiaceae και το χαμομήλι που ανήκει στην οικογένεια των Asteraceae.

Οικογένεια Lamiaceae- Χαρακτηριστικά

Η οικογένεια με τον μεγαλύτερο αριθμό αρωματικών φυτών στην Ελλάδα είναι η οικογένεια Lamiaceae (Χειλανθή). Χαρακτηρίζεται από πολυάριθμα είδη των ξηρών και θερμών κλιματικών περιοχών, με πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα όπως ο τετράγωνος βλαστός με τα αντιθέτως φυόμενα φύλλα, η διάταξη των ανθέων που σχηματίζουν μονοχάσια ή διχάσια, η συμπέταλη στεφάνη, ο συσσέπαλος κάλυκας που περικλείει τον σωλήνα της στεφάνης, οι τέσσερις άνισοι στήμονες που σχηματίζουν δύο ζεύγη, η επιφυής δικαρποφυλλική ωοθήκη και τα αιθέρια έλαια που παράγουν σε ειδικούς αδένες του βλαστού, των φύλλων και των ανθέων. Στην Ελλάδα φύονται πολλά είδη της οικογένειας Lamiaceae τα οποία δεν είναι χρήσιμα μόνο ως αρωματικά αλλά και ως φαρμακευτικά, αρτυματικά, καλλωπιστικά και μελισσοτροφικά. Τα πιο κοινά είναι: [θυμάρι](#) (*Thymus capitatus*), [θρούμπι](#) (*Satureja thymbra*), [φασκόμηλο](#) (*Salvia fruticosa*), [ρίγανη](#) (*Origanum vulgare*), [δίκταμος](#) (*Origanum dictamnus*), μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*), [Λεβάντα](#) (*Lavandula stoechas*), [τσάι του βουνού](#) (*Sideritis scardica*), [Μέντα](#) (*Mentha spicata*), [δενδρολίβανο](#) (*Rosmarinus officinalis*).

Οικογένεια Clusiaceae

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν περίπου 150 είδη ποωδών και θαμνωδών φυτών ή και φρύγανα. Τα δυο κυριότερα είδη της οικογένειας είναι το *Hypericum perforatum* και το *Hypericum perforatum*.

Οικογένεια Asteracea

Είναι γνωστή ως οικογένεια των σύνθετων (compositae) ή των αστεριδών (asteraceae) φυτών. Χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι η σύνθετη μορφολογία των ταξιανθιών της. Τα λουλούδια τους δεν είναι πραγματικά άνθη, αλλά ψευδάνθη. Δηλαδή, τροποποιημένες ταξιανθίες που ονομάζονται «κεφάλια» ή «καλαθίδια». Ο κεντρικός βλαστός της ταξιανθίας είναι συμπυκνωμένος σε μια πλακοειδή δομή, πάνω στον οποίο βρίσκονται τα ανθίδια, καθένα από τα οποία είναι μικροσκοπικά άνθη. Υπάρχουν δύο ειδών ανθίδια. Τα δισκοειδή -με πορτοκαλί-κίτρινο τμήμα του κεφαλιού της μαργαρίτας- και τα ακτινοειδή με τα λευκά

πεταλοειδή στοιχεία στην περιφέρεια. Κάθε λευκή ακτίνα αποτελείται από τα συνενωμένα πέταλα ενός άνθους. Αν κοπεί με απότομη κίνηση, αφαιρείται όλο το ανθίδιο. Τέλος κάποιες μαργαρίτες μπορεί να μην έχουν καθόλου ακτινωτά ανθίδια. Οι ανθέμίδες ή μαργαρίτες φυτρώνουν σχεδόν παντού και ανθίζουν για μεγάλο διάστημα του χρόνου.

1.1.2.1 Αντωνάϊδα ή Τεύκριο (*Origanum Microphyllum*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Origanum*. Για το συγκεκριμένο φυτό δεν υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα. Πρόκειται για ένα φυτό ενδημικό της Κρήτης το οποίο εντοπίζεται στη Δυτική και Ανατολική Κρήτη κυρίως σε υψόμετρο 400-900 μέτρων. Όσον αφορά στα μορφολογικά του χαρακτηριστικά,



Εικόνα 1.10 *Origanum microphyllum*

είναι πολυετής μικρός θάμνος, ο οποίος φέρει πολλούς βλαστούς που έχουν μήκος 20-50 εκατοστά και οι οποίοι είναι συνήθως διακλαδισμένοι. Τα φύλλα των κύριων βλαστών του είναι έμμισχα ωοειδή προς επιμήκη, αμβλεία, στρογγυλεμένα ή αντικαρδιοειδή στη βάση τους, ελάχιστα χνουδωτά ή με λευκό χνούδι και δυσδιάκριτες ενώσεις ενώ έχουν μήκος που κυμαίνεται από 4 έως 8 χιλιοστά. Η στεφάνη του έχει συνήθως πορφυρό χρώμα και το μήκος της είναι 5 χιλιοστά (Εικόνα 1.10). Η περίοδος ανθοφορίας είναι από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο και η ταξιανθία του εντοπίζεται στην άκρη του βλαστού.

Έχει αποδειχθεί από έρευνες ότι η ευεργετική του δράση στην υγεία οφείλεται στα αιθέρια έλαια που περιέχει. Τα ενεργά συστατικά που εντοπίζονται στα αιθέρια έλαια του φυτού και, μάλιστα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι η φαινόλη καρβακρόλη και τα τερπένια α-τερπινένιο, γ-τερπινένιο, τερπέν-4-όλη, λιναλοόλη (τερπένιο αλκοόλης) και σαβιδένιο. Τα παραπάνω συστατικά αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν ισχυρή ανтимικροβιακή δράση εναντίον Gram (+) και Gram(-)

βακτηρίων αλλά και εναντίον μυκήτων (Aligiannis et al,2001). Χρησιμοποιείται, ακόμη, για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, ιδιαίτερα για περιπτώσεις κρυολογήματος και γρίπης. Άλλες χρήσεις του είναι σαν εφιδρωτικό για τον πυρετό και μερικές περιπτώσεις ρευματισμών ενώ θεωρείται, επίσης, ότι ανακουφίζει από τη δυσπεψία προκαλώντας διέγερση των γαστρικών υγρών, διεγείρει το ήπαρ, τους νεφρούς και τη χοληδόχο κύστη και επιταχύνει τη θεραπεία τραυμάτων και αποστημάτων (εξωτερική χρήση). Παρά τις πικρές ουσίες που περιέχει, έχει ευχάριστο άρωμα και μπορεί να καταναλωθεί τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό με άλλα βότανα (μέντα, τσάι του βουνού) σε μορφή ροφήματος.

1.1.2.3 Δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Rosmarinus*. Είναι, επίσης, γνωστό και ως ρόσμαρι. Πρόκειται για έναν αρωματικό, αειθαλή, πυκνόφυλλο και πολύκλαδο πράσινο θάμνο, το ύψος του οποίου δεν ξεπερνάει τα 2 μέτρα. Τα φύλλα του είναι μικρά, δερματώδη, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες. Η πάνω επιφάνεια των



Εικόνα 1.11 *Rosmarinus officinalis*

φύλλων έχει χρώμα σκούρο πράσινο και η κάτω επιφάνεια είναι ελαφρώς χνουδωτή με χρώμα λευκό ή αχνά γκριζωπό. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες και βγαίνουν στις μασχάλες των φύλλων και το χρώμα τους μπορεί να είναι μωβ, κυανόλευκο ή και λευκό. Δεν έχει ιδιαίτερη ανάγκη από πότισμα και μπορεί να φυτρώσει και σε βραχώδεις ορεινές περιοχές καθώς πρόκειται για ένα πολύ ανθεκτικό φυτό που προσαρμόζεται πολύ εύκολα στην περιοχή που φύεται και αντέχει ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας με καταλληλότερη περίοδο ανθοφορίας τους μήνες της άνοιξης (Εικόνα 1.11). Οι βλαστοί έχουν ευχάριστο άρωμα που μοιάζει με αυτό του τσαγιού και η γεύση τους είναι ελαφρώς πικρή και λίγο καυτερή.

Στο δενδρολίβανο αποδίδονται πλήθος ευεργετικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι αποτελεί ισχυρό τονωτικό, που διεγείρει τη λειτουργία της πέψης, της χολής και του ήπατος. Επιπλέον, θεωρείται αντιοξειδωτικό καθώς προστατεύει και ισχυροποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα (*Bozin et al., 2007 & Gachkar et al., 2007 & Oh et al., 2012*), βοηθά σε περιπτώσεις αρτηριοσκλήρυνσης και τονώνει τη λειτουργία της καρδιάς, είναι διεγερτικό της κυκλοφορίας του αίματος και ενδείκνυται για περιπτώσεις ατονίας, υπερκόπωσης, εξάντλησης, κατάθλιψης, αϋπνίας και άγχους. Το φυτό έχει, επίσης, αντισηπτικές, αντιβακτηριδιακές και αποχρεμπτικές ιδιότητες, ενώ είναι εφιδρωτικό και σπασμολυτικό και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις κρυολογήματος, βήχα, βρογχίτιδας και άσθματος (*Bozin et al., 2007*). Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα από φύλλα του φυτού μπορεί να εμποδίσει αλλαγές σε βιοχημικούς δείκτες που επηρεάζονται σε περιπτώσεις καρκίνου και σχετίζονται με την έναρξη και τη μετάσταση της νόσου (*Ho et al., 1994*). Μπορεί να βοηθήσει σε περιπτώσεις δυσπεψίας, μετεωρισμού, κολικών, διάρροιας και γενικότερων προβλημάτων του πεπτικού και χρησιμοποιείται συχνά και ως αντιρρευματικό. Στις ευεργετικές του δράσεις αναφέρονται ακόμη ενίσχυσης της μνήμης, βελτίωση της εγκεφαλικής λειτουργίας και της γνωστικής ικανότητας. Το αφέψημα από δενδρολίβανο μπορεί, ακόμη, να δράσει κατά της τριχόπτωσης και της πιτυρίδας. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως συντηρητικό τροφίμων (*Gachkar et al., 2007*).

Από την ανάλυση της σύστασης του αιθέριου ελαίου από το δενδρολίβανο προέκυψε ότι αυτό περιέχει σε σημαντικές συγκεντρώσεις τα ακόλουθα χημικά συστατικά στα οποία αποδίδεται και η αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν: καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καρνοσικό οξύ, ροσμανόλη, ροσμαδιόλη, 1,8-κινεόλη, καρνοσόλη, βορνεόλη, α-πινένιο, β-πινένιο (*Wang et al., 2007*), ουρσολικό οξύ (πεντακυκλικό τριτερπένιο). Περιέχει ακόμη σημαντικές ποσότητες βιταμίνης Α και C.

1.1.2.2 Δίκταμο (*Origanum dictamnus*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Origanum*. Ονομάζεται διαφορετικά και έρωντας. Πρόκειται για ενδημικό φρύγανο της Κρήτης και

αυτοφύεται σε όλα τα βουνά του νησιού κι όχι μόνο στο όρος Δίκη όπως δηλώνει το όνομά του και όπου στο παρελθόν αφθονούσε. Εξαπλώνεται από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τα 1.600 μ. αποκλειστικά σε γκρεμούς και φαράγγια. Είναι ένα μικρό φυτό με μήκος 30 έως 40 εκατοστά, έχει πολύ δυνατή οσμή και γεύση ενώ τα φύλλα του έχουν γκριζοπράσινο χρώμα, είναι σχετικά μικρά αλλά παχουλά και καλύπτονται από χνούδι. Τα άνθη του έχουν βιολετί χρώμα (Εικόνα 1.12). Η περίοδος ανθοφορίας του διαρκεί από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο.



Εικόνα 1.12 *Origanum dictamnus*

Στη Μινωική Κρήτη και την Αρχαία Ελλάδα ήταν ένα από τα σπουδαιότερα φαρμακευτικά φυτά. Ο πατέρας της ιατρικής, Ιπποκράτης, το χρησιμοποιούσε για τις παθήσεις του στομάχου και του πεπτικού συστήματος, στους ρευματισμούς, τα αρθρικά, ως επουλωτικό, εμμηναγωγό, τονωτικό και αντισπασμωδικό. Στις μέρες μας χρησιμοποιείται ως καταπραϋντικό του πεπτικού συστήματος, κατά της γρίπης και του κρυολογήματος ενώ πιστεύεται ότι δρα σπασμολυτικά και συμβάλει στην πρόληψη και την αντιμετώπιση των κυκλοφορικών και καρδιολογικών προβλημάτων. Επιπλέον, ανακουφίζει από πονοκεφάλους, πονόδοντους και αποστήματα, ενεργεί ως αντιδιαβητικό, εμμηναγωγό αλλά και ως αφροδισιακό. Το πλήθος των περιπτώσεων στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί οδήγησε στην ανάγκη να προσδιοριστούν τα ενεργά του συστατικά.

Από έρευνες αποκαλύφθηκε ότι το δίκταμο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε φυτοχημικά, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι πολυφαινόλες και τερπένια. Ειδικότερα, έπειτα από εκχύλιση με πολικούς και μη- πολικούς διαλύτες αποδείχθηκε ότι περιέχει απιγενίνη, κερκετίνη, καμπερόλη, κατεχίνες, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ και τριτερπένια ενώ στο αιθέριο έλαιο αυτού βρέθηκαν καρβακρόλη, π- κιμένιο και γ- τερπινένιο (*Proestos et al., 2008, Chatzopoulou et al., 2010*) σε μεγάλες συγκεντρώσεις (*Argyropoulou et al., 2009,*

Liolios et al., 2009). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει και σημαντική αντιμικροβιακή δράση.

1.1.2.4 Θρύμπα (*Satureja thymbra*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Satureja*. Είναι γνωστό, επίσης, και ως θρούμπι ή θύμπρα. Πρόκειται για έναν πολυετή, ποώδη θάμνο, το ύψος του οποίου δεν ξεπερνάει τα 40 εκατοστά, με μικρά, ίσια και σκληρά φύλλα που φέρουν μαύρες βούλες. Τα άνθη του είναι ροζ ή άσπρα και οι σπόροι του έχουν



Εικόνα 1.13 *Satureja thymbra*

καστανό χρώμα και ευχάριστο άρωμα (Εικόνα 1.13). Ευδοκimei κυρίως στην Ανατολική Μεσόγειο ιδιαίτερα σε ξηρές και βραχώδεις περιοχές ενώ η καλύτερη περίοδος ανθοφορίας του είναι από μέσα Απριλίου έως αρχές Μαΐου.

Μερικές από τις δράσεις που αποδίδονται στη θρύμπα είναι οι ακόλουθες: δρα ως ορεκτικό και βοηθάει στην πέψη, είναι ωφέλιμο για το στομαχικό άλγος και σε περιπτώσεις διάρροιας, διεγείρει και τονώνει τον οργανισμό, έχει αποχρεμπτικές ιδιότητες γι αυτό και συστήνεται σε περιπτώσεις κρυολογήματος και βήχα, καταπολεμά την αϋπνία και δρα θετικά σε παθήσεις του νευρικού συστήματος, λειτουργεί ως καταπραϋντικό των ρευματικών αρθρικών πόνων, είναι ευεργετικό στην ουρική αρθρίτιδα και σε περιπτώσεις πέτρας στους νεφρούς και δρα εναντίον των εντερικών παρασίτων. Επιπλέον, πιστεύεται ότι βελτιώνει την ακοή. Σε περίοδο εγκυμοσύνης είναι προτιμότερο να αποφεύγεται καθώς είναι πιθανό να προκληθεί αποβολή του εμβρύου λόγω συσπάσεων της μήτρας.

Από μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι τα είδη του γένους *Satureja* παρουσιάζουν αναλγητική, αντισηπτική, αντιμικροβιακή, αντιαρτηρική, αντιμυκητιασική, αντιδιαρροϊκή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική και αγγειοδιασταλτική δράση ενώ πιστεύεται, ακόμη, ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειώνει τα επίπεδα χοληστερίνης καθώς ότι

χρησιμεύουν, επίσης, ως συντηρητικά τροφίμων για την προστασία από την ανάπτυξη τροφογενών παθογόνων (Chorianopoulos et al., 2004 & Momtaz et al., 2010). Οι δράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω αποδίδονται στα συστατικά που περιέχονται σε αυτό το βότανο. Συγκεκριμένα, έχουν προσδιοριστεί π-κυμένιο, γ-τερπινένιο, καρβακρόλη, θυμόλη και λιναλοόλη.

1.1.2.5 Θυμαρί (*Thymus vulgaris*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Thymus*. Μορφολογικά, είναι ένας πολυετής, πολύκλαδος μικρός θάμνος με ύψος έως 30 εκατοστά. Φέρει όρθιους χνουδωτούς βλαστούς, οι οποίοι είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί. Τα φύλλα του θυμαριού είναι μικρά, στενά, σκληρά και ωοειδή και όταν ξεραθούν, αποκτούν καφεπράσινο χρώμα ενώ το άρωμα τους αναδύεται όταν θρυμματιστούν. Η γεύση τους είναι πολύ δυνατή και ελαφρώς καυστική. Απαντάται στις νότιες και μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης, σε διάφορες περιοχές της Ασίας ενώ καλλιεργείται και στη βόρεια Αμερική. Στην Ελλάδα εντοπίζονται 23 αυτοφυή είδη, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι τα *Thymus capitatus*, *Thymus striatus* και *Thymus atticus* (Εικόνα 1.14). Η καλύτερη περίοδος ανθοφορίας του είναι τους καλοκαιρινούς μήνες.



Εικόνα 1.14 *Thymus vulgaris*

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του θυμαριού είναι γνωστές από την εποχή του Ιπποκράτη. Αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο φυτό καθώς παρουσιάζει πλήθος δράσεων που αφορούν στην υγεία και αποτελεί ένα από τα καλύτερα αντισηπτικά και τονωτικά βότανα. Το εκχύλισμά του μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο κρυολόγημα, τη γρίπη, το βήχα, τις βρογχίτιδες, σε εντερικές διαταραχές και δερματικές λοιμώξεις. Λειτουργεί ως αντισπασμωδικό των πεπτικών οδών, διευκολύνει την πέψη, ηρεμεί τις νευρικές συσπάσεις του στομάχου και του εντέρου ενώ συμβάλλει, επίσης, στην καταπολέμηση του άγχους και της σωματικής και πνευματικής κατάπτωσης. Μπορεί

να χρησιμοποιηθεί στον καθαρισμό πληγών και να ανακουφίσει από τους πόνους των ρευματικών παθήσεων. Δρα ως εφιδρωτικό σε καταστάσεις πυρετού απομακρύνοντας τοξίνες από το αίμα, ως αποχρεμπτικό, ως διουρητικό (για περιπτώσεις οιδημάτων) αλλά και ως εμμηναγωγό. Ασκήι ευεργετική δράση στην καρδιά και το κυκλοφορικό σύστημα ενώ μπορεί να ανεβάσει την αρτηριακή πίεση και να βοηθήσει σε περιπτώσεις ορθοστατικής υπότασης. Εμφανίζει, ακόμη, και φυτοπροστατευτική δράση.

Από την ανάλυση της σύστασης του θυμαριού και του αιθέριου ελαίου του, βρέθηκε ότι έχει μεγάλες συγκεντρώσεις θυμόλης (γνωστή και ως καμφορά του θυμαριού) που είναι μια ουσία (μονοτερπένιο) με αντιμικροβιακή και μυκητοκτόνο δράση. Περιέχει, επίσης, βορνεόλη, καρβακρόλη, α-τερπινεόλη, θυμόλη, 1,8 κινεόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη, α-πινένιο, καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, απιγενίνη και μονοτερπένια (α- και γ-τερπινένιο), π-κυμένιο και καρυοφυλλένιο (*Takeuchi et al., 2004 & Lee et al., 2005*). Η αντιμικροβιακή και αντισηπτική δράση που παρουσιάζει το καθιστά ικανό να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό τροφίμων εναντίον της ανάπτυξης τροφογενών παθογόνων και αποδίδεται κυρίως στην παρουσία της θυμόλης και της καρβακρόλης (*Chorianopoulos et al., 2004*). Έχει διαπιστωθεί, ακόμη, και αντιοξειδωτική δράση του θυμαριού, η οποία αποδίδεται κυρίως στην παρουσία της θυμόλης και της καρβακρόλης (*Miura et al., 2002 & Lee et al., 2005*).

Ωστόσο, το θυμάρι όπως και όλα τα βότανα πρέπει να καταναλώνονται με προσοχή καθώς η συνεχής χρήση του ενδέχεται να προκαλέσει δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένος, ζαλάδες, διάρροια και καρδιακή κατάπτωση. Συστήνεται, επίσης, να μην καταναλώνεται από υπέρτασικά άτομα καθώς, όπως προαναφέρθηκε, αυξάνει την αρτηριακή πίεση. Επιπρόσθετα, καθώς προκαλεί διέγερση της μήτρας είναι προτιμότερο να αποφεύγεται η χρήση του κατά τη διάρκεια της κύησης. Τέλος, πρέπει να αποφεύγεται η χρήση του θυμαριού μαζί με αλκοόλ καθώς το πρώτο μπορεί να αυξήσει την απορροφητικότητα του δεύτερου και να αποδειχθεί επικίνδυνο.

1.1.2.6 Μαντζουράνα (*Origanum majorana*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Origanum*. Είναι φυτό ιθαγενές των χωρών της Μεσογείου, φύεται κυρίως σε βραχώδεις περιοχές της Κρήτης και της Κύπρου και είναι συγγενικό της ρίγανης. Πρόκειται για ένα πολυετές, αυτοφύες φυτό που το ύψος του φτάνει μέχρι 60 εκατοστά.



Εικόνα 1.15 *Origanum majorana*

Ο βλαστός του είναι όρθιος, τετραγωνικός, πολύκλαδος και σχεδόν λείος με ύψος από 20-50 εκατοστά, και τα άνθη του είναι μικρά και λευκού-ροζ χρώματος. Τα φύλλα του είναι μικρά, τοποθετημένα αντίθετα, χνουδωτά, ωοειδή, έχουν γκρι έως πράσινο χρώμα και χαρακτηριστική οσμή λεβάντας (Εικόνα 1.15). Όλο το φυτό έχει σταχτοπράσινο χρώμα και η περίοδος ανθοφορίας του είναι από το καλοκαίρι μέχρι το φθινόπωρο ενώ παρουσιάζει μειωμένη ανθεκτικότητα ανάλογα με τις συνθήκες.

Στην Ελλάδα η μαντζουράνα είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια όπου την χρησιμοποιούσαν ως φάρμακο κατά στομαχικών και εντερικών ενοχλήσεων. Ο Γαληνός προέτρεπε την χρήση της προκειμένου να διεγερθεί η πέψη. Βρίσκει εφαρμογή σε πολλές μαγειρικές μεθόδους, ως μπαχαρικό ενώ χρησιμοποιείται και ως καλλωπιστικό και στην αρωματοποιία. Το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από τη μαντζουράνα χρησιμοποιείται ως αντισπασμωδικό και αντισηπτικό αλλά και για την καταπολέμηση του βήχα, του κρυολογήματος, του πονοκεφάλου, του κοιλιακού άλγους, του άγχους και της αϋπνίας.

Όσον αφορά τη διερεύνηση της δράσης αυτού του βοτάνου στην υγεία δεν έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες και μέχρι σήμερα έχει προσδιοριστεί το συνολικό του περιεχόμενο σε φυτοχημικά συστατικά. Οι ουσίες που έχουν βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα αιθέρια έλαια του είναι η λιναλοόλη, η τερπινεν-4-όλη και η τερπινεόλη καθώς και καρνοσικό οξύ, καρνεσόλη και ουρσολικό οξύ (Vgi et al., 2005) και α- και γ- τερπινένιο, π-κυμένιο και καρβακρόλη (Baranauskiene et al., 2006 & Politeo et al., 2006). Αποδείχθηκε, επίσης, αντιοξειδωτική δράση της μαντζουράνας με τη μέθοδο DPPH (Vgi et al., 2005).

1.1.2.7 Μελισσόχορτο (*Melissa officinalis*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Mentha*. Είναι γνωστό και ως μελισσοβότανο ή κιτροβάλσαμο. Πρόκειται για πολυετή πόα ύψους 70-150 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι ελαφρά οδοντωτά με αραιό τρίχωμα. Το καλοκαίρι, που είναι και η περίοδος ανθοφορίας του, βγάζει 6-12 μικρά υποκίτρινα ή άσπρα άνθη, τοξοειδή και μελιτογόνα (γεμάτα με νέκταρ) 10-14



Εικόνα 1.16 *Melissa officinalis*

χιλιοστών στους σπονδύλους. Το φυτό είναι ιθαγενές της νότιας Ευρώπης και της περιοχής της Μεσογείου, αλλά σήμερα καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο καθώς έχει αποδειχθεί ότι έχει φαρμακευτική δράση. Περιέχει υψηλό ποσοστό κιτράλης αλλά και άλλων ουσιών όπως κιτρονελλάλη, λιναλοόλη και γερανιόλη, στις οποίες οφείλει το έντονο άρωμα του που θυμίζει κυρίως το άρωμα του λεμονιού και λιγότερο της μέντας (Εικόνα 1.16).

Όσον αφορά τις δράσεις του στην υγεία, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι το ρόφημα από φύλλα μελισσόχορτου έχει αντισπασμωδική, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση ενώ δρα και ως τονωτικό του κυκλοφορικού συστήματος και της καρδιάς. Επίσης έχει δειχθεί ότι έχει αντιμικροβιακή δράση, αν και αυτή είναι πολύ πιο ασθενής από ότι άλλων φυτών (*Nascimento et al., 2000*). Παρουσιάζει αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιασική δράση (*Mimica- Dukic et al., 2004*) και έχει χρησιμοποιηθεί εναντίον του ιού του έρπητος, ενώ τα τελευταία χρόνια γίνονται και κλινικές δοκιμές προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο συμβάλλει στην αντιμετώπιση του ιού HIV. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για να αντιμετωπιστεί η αϋπνία, το άγχος, την κατάθλιψη και διάφορες πεπτικές διαταραχές (για παράδειγμα, νευρική δυσπεψία) και περιπτώσεις έλκους. Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι η κατανάλωση του αυξάνει την έκκριση προσταγλανδίνης E2 και βλεννίνης μειώνοντας την έκκριση οξέων. *In vitro* έρευνες έδειξαν ότι δρα ανασταλτικά στην τρανσαμινάση του GABA, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την δράση του ως ηρεμιστικό. Το υπεύθυνο συστατικό φαίνεται να είναι το ροσμαρινικό οξύ (*Awad et al., 2009*). Επιπλέον,

βελτιώνει την πνευματική διαύγεια και την μνήμη και έχει βοηθήσει σε μικρό αριθμό κλινικών δοκιμών ανθρώπους που πάσχουν από ήπια συμπτώματα της νόσου Alzheimer (Akhondzadeh, 2003). Τέλος, πιστεύεται ότι το μελισσόχορτο παρουσιάζει αντιθυρεοειδοτροπική δράση καθώς είναι ανταγωνιστικός αναστολέας του υποδοχέα της TSH. Με αυτό το τρόπο το μελισσόχορτο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία του συνδρόμου Graves και τον υπερθυρεοειδισμό.

Τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν διεξαχθεί αποδεικνύουν ότι το μελισσόχορτο είναι πλούσιο σε πολλά ενεργά συστατικά, όπως αιθέρια έλαια (0.02-0.3%), πολυφαινόλες (χλωρογενικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κουμαρινικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ), φλαβονοειδή, μονοτερπένια (30-40%) και σεσκιτερπένια, όπως β-καρνοφυλλένιο (Dukic et al., 2004 & Dastmalchi et al., 2008) ενώ περιέχει και ασκορβικό οξύ σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις και κιχωρικό οξύ (Capecka et al., 2005 & Lee, 2010). Αν και τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι πολύ ενθαρρυντικά, χρειάζεται να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα προκειμένου να ελεγχθεί καλύτερα η αντιοξειδωτική δράση του συγκεκριμένου βοτάνου.

1.1.2.8 Ρίγανη (*Origanum vulgare*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Origanum*. Είναι αρωματικό ποώδες, πολυετές, ιθαγενές και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Το φυτό έχει ύψος 20-80 εκατοστά, έχει φύλλα τοποθετημένα αντίθετα μήκους 1-4 εκατοστά. Αναπτύσσεται καλά σε εδάφη ισχυρά αλκαλικά, με pH 6-9 και μπορεί να εκμεταλλευτεί ακόμα και



Εικόνα 1.17 *Origanum vulgare*

όταν καλλιεργείται σε ξηρά και πετρώδη εδάφη. Τα άνθη της έχουν χρώμα μωβ-λευκό και η καταλληλότερη περίοδος ανθοφορίας της είναι από τον Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο αναλόγως της περιοχής. Η συλλογή της ρίγανης γίνεται κατά την ανθοφορία του φυτού, τα άνθη του ξηραίνονται σε ειδικά υπόστεγα ή ξηραντήρια και

στη συνέχεια τρίβονται και κοσκινίζονται. Η ελληνική ρίγανη, η οποία είναι αυτοφυής σε ορεινά και βραχώδη εδάφη, θεωρείται η καλύτερη παγκοσμίως από άποψη ποιότητας και πέραν της χρήσης της στη μαγειρική (τόσο στην ελληνική αλλά και στην ιταλική κουζίνα) έχει αποδειχθεί ότι έχει σημαντικά οφέλη για την υγεία (φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις) (Εικόνα 1.17).

Η φαρμακευτική χρήση της ρίγανης χρονολογείται από την αρχαιότητα. Στη χώρα μας, η ρίγανη χρησιμοποιείται ως αντιφλεγμονώδες, αντισπασμωδικό, βακτηριοκτόνο αλλά και ως αντιδιαρροϊκό. Υπό τη μορφή αφεψήματος, χρησιμοποιείται για την ατονία των εντέρων, ως αποχρεμπτικό για το βήχα, σε περιπτώσεις άσθματος, χρόνιας βρογχίτιδας και φυματίωσης ενώ βοηθάει στην υπέρταση και την αρτηριοσκλήρυνση. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (οριγανέλαιο) χρησιμοποιείται για τον πονόδοντο. Μια άλλη εξίσου σημαντική χρήση της είναι εναντίον των ρευματικών παθήσεων αλλά και για περιπτώσεις πέτρας στους νεφρούς και την ουροδόχο κύστη και σε εξωτερικά οιδήματα.

Σχετικά με τη σύστασή της, έχει βρεθεί ότι το αιθέριο έλαιο της είναι πλούσιο σε δύο φαινόλες, τη θυμόλη και την καρβακρόλη, που είναι ισχυρά μικροβιοκτόνες ουσίες, εμποδίζουν τη δράση διάφορων μικροοργανισμών (και τροφογενών παθογόνων) και παράλληλα συμβάλλουν στην ικανότητα της ρίγανης να εκκαθαρίζει τις ελεύθερες ρίζες DPPH (αντιοξειδωτική δράση) (Chorianopoulos et al., 2004 & Capecka et al., 2005). Η ρίγανη περιέχει, επίσης, σημαντικές ποσότητες από ροσμαρινικό οξύ, α- και γ-τερπινένιο, π-κυμένιο, καφεϊκό οξύ και p-κουμαρικό οξύ (Russo et al., 1998 & Figueredo et al., 2006 & Hazzit et al., 2006). Επιπλέον, η ρίγανη είναι πλούσια σε β-καροτίνη, σίδηρο και φυτικές ίνες, οι οποίες μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα ενώ έχει αποδειχθεί ότι ανατέλλει την υπεροξειδωση του λινολεϊκού οξέος (LA) (Capecka et al., 2005).

1.1.2.9 Σπαθόχορτο ή Υπερικό (*Hypericum perforatum*)

Ανήκει στην οικογένεια Clusiaceae και το γένος *Hypericum*. Είναι ευρύτερα γνωστό ως Υπερικό, Σπαθόχορτο ή βάλσαμο. Ο όρος "διάτρητον" (perforatum) οφείλεται στις μικρές κύστες που σχηματίζουν τα φύλλα του λόγω του ελαίου, οι οποίες μοιάζουν με τρύπες. Το σπαθόχορτο είναι ένα χαρακτηριστικό φυτό της Ευρώπης, της Βόρειας

Αφρικής και της Ασίας. Σχηματίζει θάμνο που μπορεί να φτάσει μέχρι και 1 μέτρο, τα κλαδιά του είναι ελαφρά ξυλώδη και όταν ανθίζει φέρει χρυσοκίτρινα άνθη. Τα φύλλα του είναι ωοειδή προς γραμμικά, άμισχα και αντίθετα κατανεμημένα ενώ οι στήμονες του έχουν ιδιαίτερη μορφή, με στερεό κυλινδρικό στέλεχος, με δύο γραμμές που εξέχουν κατά μήκος. Αυτές οι γραμμές κάνουν τον στήμονα να μοιάζει επίπεδος, πράγμα εντελώς ασυνήθιστο στον κόσμο των φυτών. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο. Φύεται συνήθως σε λιβάδια, χωράφια



Εικόνα 1.18 *Hypericum perforatum*

και πλαγιές βουνών. Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του είναι ότι τα φύλλα του περιέχουν έλαιο. Αν κανείς στρέψει τα φύλλα του στο φως, εμφανίζονται ημιδιάφανα στίγματα και μαυροκόκκινες κουκκίδες και φαίνονται σαν να είναι γεμάτα τρύπες, γεγονός που οφείλεται στα μικρά κύτταρα των φύλλων του που περιέχουν έγχρωμο αιθέριο έλαιο (σπαθόλαδο) και ρητίνες (Εικόνα 1.18).

Από την αρχαιότητα το βαλσαμόχορτο ήταν γνωστό για την αποτελεσματική αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων, για την επουλωτική του δράση σε τραύματα και μικρής έκτασης εγκαύματα (σε μορφή αλοιφής) καθώς και για την καταπραϊντική δράση σε περιπτώσεις ισχιαλγίας. Αναφορές υπάρχουν ήδη από την εποχή του Γαληνού και του Διοσκουρίδη. Χρησιμοποιείται, επίσης, ως διουρητικό, εμμηναγωγό και αντισπασμωδικό και πιστεύεται ότι βοηθάει σε περιπτώσεις αϋπνίας, πονοκεφάλου και ρευματικών παθήσεων αλλά και για στομαχικές και εντερικές διαταραχές. Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί και η συμβολή του σε περιπτώσεις κατάθλιψης (σε μορφή αφεψημάτων) και τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και φάνηκε ότι παρουσιάζει χημειοπροστατευτική δράση καθώς μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη αυτής της μορφής καρκίνου καθώς και να εμποδίσει την εμφάνιση υποτροπών αυτής. Τέλος, έχουν αναφερθεί αντιπυρετικές, αντισηπτικές, αντιμικροβιακές και στυπτικές ιδιότητες.

Υπάρχει πλήθος μελετών που αποκαλύπτουν τη σύσταση του σπαθόχορτου. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι περιέχει υπερίκίνη, μια φθορίζουσα και φωτοευαίσθητη χημική ουσία στην οποία αποδίδεται σε σημαντικό ποσοστό η αντικαρκινική του δράση, ψευδοϋπερίκίνη, υπερφορίνη καθώς και πλήθος φυτοχημικών όπως κερκετίνη, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, καμπφερόλη, p-κουμαρικό οξύ, χλωρογενικά οξέα, α- και β-πινένιο, β-καρυοφυλλένιο, γερανιόλη, λουτεολίνη, ταννίνες και ξανθόνες (*Saddique et al., 2010*), συστατικά στα οποία αποδίδεται το μεγάλο εύρος θεραπευτικών δράσεων του στην υγεία. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, το βαλσαμόχορτο μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση του απλού έρπητα, του συνδρόμου χρόνιας κόπωσης και του AIDS. Ασθενείς με AIDS που δέχτηκαν να ακολουθήσουν αγωγή η οποία βασιζόταν μεταξύ άλλων και στο σπαθόχορτο, δήλωσαν πως ένιωθαν πιο αισιόδοξοι, με περισσότερη ενέργεια και λιγότερη κούραση.

Υπάρχουν, ωστόσο και ορισμένα στοιχεία που αφορούν στη χρήση του υπερίκου και πρέπει να ληφθούν υπόψη καθώς αφορούν σε αντενδείξεις και ενδεχόμενες παρενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν. Ειδικότερα, η υπερίκίνη μπορεί να επηρεάσει τον οργανισμό προκαλώντας ευαισθησία στο φως. Σε ορισμένα δέρματα μπορεί να προκαλέσει αντίδραση φωτοευαισθησίας και φωτοδερματίτιδας, που εκδηλώνεται με δερματικούς ερεθισμούς, συμπεριλαμβανομένου του στόματος, της μύτης και των αυτιών. Μετά τη χρήση του δεν πρέπει να ακολουθεί έκθεση στο φως, γι αυτό είναι προτιμότερο να καταναλώνεται βραδινές ώρες. Τα σκουρόχρωμα δέρματα συνήθως δεν προσβάλλονται. Επιπλέον, σε κάποια πειραματόζωα φάνηκε να επηρεάζει τη θερμορύθμιση. Ωστόσο, τέτοια περιστατικά είναι σπάνια. Ακόμη, σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες, το σπαθόχορτο ενδέχεται να επηρεάσει το μεταβολισμό ορισμένων ενζύμων και κατά συνέπεια χρειάζεται προσοχή όταν χορηγείται ταυτόχρονα με άλλα φάρμακα. Επίσης, επειδή επηρεάζει κάποιους νευροδιαβιβαστές, μπορεί να αλληλεπιδρά με διάφορα ψυχοτρόπα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων άλλων αντικαταθλιπτικών. Οι γυναίκες που εγκυμονούν ή οι μητέρες που θηλάζουν δεν πρέπει να λαμβάνουν το υπερίκο σε καμία μορφή.

1.1.2.10 Τσάι του Βουνού (*Sideritis syriaca*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Sideritis*. Πρόκειται για το γνωστό τσάι του βουνού. Είναι γνωστό και ως μαλοτήρα ή σιδερίτης. Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περίπου 80 είδη που φύονται στις παραμεσόγειες χώρες, τις Κανάριες νήσους και τη Βόρειο Ασία. Το συγκεκριμένο είδος είναι αυτοφύες της Κρήτης, βρίσκεται σε πετρώδεις και βραχώδεις περιοχές, ευδοκimei σε μεγάλα



Εικόνα 1.19 *Sideritis syriaca*

υψόμετρα (πάνω από 900 μέτρα) ειδικά στα Λευκά Όρη και τον Ψηλορείτη, και παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα. Όσον αφορά στα μορφολογικά του χαρακτηριστικά, είναι πολυετής θάμνος ύψους έως 50 εκατοστά, με λεπτούς και στρογγυλούς κλάδους, ενίοτε χνουδωτούς, τα φύλλα του είναι χνουδωτά, ελλειψοειδή και σαρκώδη και τα άνθη του είναι μικρά, έχουν χρώμα λευκό ή κίτρινο, δε φέρουν βράκτια και συνήθως τοποθετούνται κατά απομακρυσμένους σπονδύλους (Εικόνα 1.19).

Παραδοσιακά χρησιμοποιείται σε κρυολογήματα και φλεγμονές του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, χάρη στις αντισηπτικές, βακτηριοστατικές και αποχρεμπτικές του ιδιότητες. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως καταπραϋντικό για το στομαχικό άλγος και το βήχα, ως διουρητικό για την ελάττωση της αρτηριακής πίεσης, ως τονωτικό για τη διέγερση της καρδιακής λειτουργίας, ως σπασμολυτικό, ως αντιαναιμικό καθώς περιέχει σίδηρο και ως εφιδρωτικό. Πιστεύεται, ακόμη, ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση.

Αν και δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τη δράση του βοτάνου αυτού, εντούτοις έχει προσδιοριστεί ως ένα βαθμό σύσταση του. Ειδικότερα, στο αιθέριο έλαιο αυτού του έχουν ανιχνευθεί ουσίες όπως η απιγενίνη, η κουμαρόλη, το χλωρογενικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ (Armata et al., 2008) καθώς και μυρκενίο σε αρκετά μεγάλο ποσοστό (Todorova et al., 1999) και κινναμωμικά οξέα (Petreska et al., 2010). Χάρη στην παρουσία αυτών των ουσιών (φλαβονοειδή, τερπενοειδή) το τσάι του βουνού πιστεύεται ότι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές,

αντιμικροβιακές καθώς και αντιοξειδωτικές ικανότητες ενώ από μελέτες έχει φανεί να δρα και ως ανασταλτικός παράγοντας για το γαστρικό έλκος σε επίμυες (Koleva et al., 2003 & Menghini et al., 2005).

1.1.2.11 Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Salvia*. Πρόκειται για ένα πολυετές, ξυλώδες και θαμνώδες φυτό το ύψος του οποίου φτάνει τα 50 εκατοστά. Βρίσκεται σε όλες της Ελλάδας και ιδιαίτερα σε ξηρά και πετρώδη μέρη. Τα φύλλα του είναι επιμήκη και παχιά και έχουν χρώμα λευκοπράσινο. Τα άνθη του έχουν χρώμα μωβ, φύονται κατά



Εικόνα 1.20 *Salvia officinalis*

σπονδύλους και ανθίζουν από το Μάιο έως τον Ιούνιο. Τα φύλλα είναι το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο τμήμα του φυτού και συλλέγονται λίγο πριν ή κατά την αρχή της ανθοφορίας. Το συγκεκριμένο βότανο στην Κίνα ονομάζεται ελληνικό βραστάρι και θεωρείται καλύτερο από το τσάι ενώ στη Γαλλία αποκαλείται ελληνικό τσάι και χρησιμοποιείται τόσο για μαγειρικούς όσο και για φαρμακευτικούς σκοπούς (Εικόνα 1.20).

Ως προς τις θεραπευτικές του ιδιότητες, το φασκόμηλο με τη μορφή αφεψήματος είναι ιδανικό για τη θεραπευτική του στόματος σε περίπτωση τραυματισμού, αφθών, φαρυγγίτιδας και ουλίτιδας. Πιστεύεται, επίσης, ότι έχει αντισηπτικές, αποχρεμπτικές, σπασμολυτικές, στομαχικές και καρδιοτονωτικές ιδιότητες, χρησιμοποιείται κατά των νευραλγιών και κατά της αρθρίτιδας ως εμμηναγωγό, διουρητικό, υπερτασικό, ανθιδρωτικό, μυκητοστατικό, αιμοστατικό και τοπικό αναισθητικό του δέρματος. Επιπλέον, η τοπική χρήση του παρέχει ανακούφιση σε τσιμπήματα εντόμων και σε πληγές με πύον ενώ είναι τονωτικό για το δέρμα του προσώπου. Μάλιστα, στο παρελθόν το χρησιμοποιούσαν για δαγκώματα από φίδια. Το συχνό λούσιμο με το αφέψημα θεωρείται ότι κάνει καλό στην τριχόπτωση. Σύμφωνα με τελευταίες έρευνες, η χρήση του έχει θετική επίδραση σε

ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer (ενισχύει τη μνήμη) και σε περιπτώσεις υπερλιπιδαιμίας. Παρά τις θετικές του επιδράσεις στην υγεία, η χρήση του πρέπει να γίνεται με μέτρο καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δηλητηρίασης από υπερβολική κατανάλωση του, κάτι που οφείλεται σε μια ουσία που περιέχει το φασκόμηλο, τη θουγιόνη.

Στο εκχύλισμα από το χαμομήλι έχουν προσδιοριστεί συστατικά όπως ροσμαρινικό οξύ (που αποτελεί και το φαινολικό οξύ με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο χαμομήλι), καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, το διτερπένιο καρνοσολικό οξύ, λουτεολίνη, απιγενίνη, κερκετίνη, p-κουμαρικό οξύ, νεοχλωρογενικό οξύ, καθώς και η χαλκόνη εσπερετίνη (Zheng & Wang, 2001 & Lu & Foo, 2001 & Santos-Gomes et al., 2002). Το χαμομήλι οφείλει όλες τις προαναφερθείσες δράσεις του στις παραπάνω ουσίες και πιο συγκεκριμένα: στην καρνοσόλη αποδίδονται οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις του (Johnson, 2001) ενώ στο ροσμαρινικό οξύ και την καρνοσόλη αποδίδεται η αντιοξειδωτική δράση (Lu & Foo, 2001 & Santos-Gomes et al., 2002). Τόσο η αντιοξειδωτική (απορρόφηση ελευθέρων ριζών οξυγόνου) όσο και η αντιμικροβιακή δράση (έχει μελετηθεί η δράση του εναντίον 13 ειδών βακτηριών και 6 ειδών μυκήτων με ισχυρότερη δράση εναντίον των *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. Enteritis* και *Shigella sonnei* (Bozin et al., 2007) του βοτάνου αυτού υποστηρίζονται από έρευνες ενώ έχει αναφερθεί και πιθανή προστατευτική δράση στα κύτταρα του ήπατος και μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης από το χαμομήλι, όπως έχει αποδειχθεί από μελέτες που έχουν γίνει σε επίμυες (Lima et al., 2004).

1.1.2.12 Φλισκούνη (*Mentha pulegium*)

Ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae και στο γένος *Mentha*. Πρόκειται για ένα πολυετές φυτό με ποικιλία μορφών. Τα φύλλα του είναι έμμισχα ωοειδή, επιμήκη και οδοντωτά ενώ το στέλεχος του είναι όρθιο ή πλάγιο, χνουδωτό και μπορεί να έχει χρώμα πράσινο ή κόκκινο. Τα άνθη του βρίσκονται σε ακραίο, στρογγυλωπό κεφάλιο και το χρώμα τους μπορεί να είναι από ερυθρό έως ανοιχτό ιώδες στις μασχάλες των φύλλων. Αρχικά, το φλισκούνη σχηματίζει ένα μικρό φυτό που αναδίδει έντονα το άρωμα μέντας, όμως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, οι μίσχοι αναπτύσσονται στητοί σε ύψος 50 εκατοστών και το ανώτερο ζευγάρι φύλλων περιβάλλεται από

σπείρες λουλουδιών. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Ιούλιο μέχρι τον Οκτώβριο. Είναι φυτό αυτοφυές που δηλώνει την ύπαρξη νερού καθώς αναπτύσσεται κατά μήκος ποταμών. Ρυακιών και γενικά σε υγρούς τόπους. Για τους θεραπευτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται τόσο τα φύλλα όσο και οι ανθισμένες κορυφές (Εικόνα 1.21).



Εικόνα 1.21 *Mentha pulegium*

Γενικά, πιστεύεται ότι το φλισκούνι έχει αρκετές θεραπευτικές δράσεις. Θεωρείται ότι έχει αντισηπτική δράση γι αυτό και χρησιμοποιείται κατά του βήχα, του πονόλαιμου, του κρυολογήματος, καταπραΰνει το στομαχικό και το εντερικό άλγος, ενισχύει την πέψη, δρα ως αντιφυσητικό και κατά της βρογχίτιδας, ως αντιδιαρροϊκό και χολαγωγό, ως σπασμολυτικό, κατά των νευρικών διαταραχών και της αϋπνίας, του ιλίγγου, της ημικρανίας, ως εφιδρωτικό γι αυτό και χρησιμοποιείται κατά του πυρετού, χρησιμοποιείται ως εμμηναγωγό και, τέλος, παρουσιάζει δράση επί του ήπατος ενώ χρησιμοποιείται και σε περιπτώσεις αρθρίτιδας (Camejo et al., 2003, Novais et al., 2004, Carvalho, 2005). Συστήνεται, ωστόσο, να αποφεύγεται η υπερβολική χρήση του κατά την εγκυμοσύνη λόγω κινδύνου αποβολής από τις συσπάσεις της μήτρας. Έχει γλυκιά γεύση και μπορεί να καταναλωθεί ως ρόφημα τόσο μεμονωμένο όσο και σε συνδυασμό με τσάι του βουνού, δυόσμο και γλυκάνισο ως αντιγριπικό ενώ ως έγχυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πλύση πληγών που περιέχουν πύον. Σε γαργάρες μπορεί να έχει ευεργετική δράση σε παθήσεις του ρινοφάρυγγα και ασθματικές καταστάσεις (ως αποχρεμπτικό) ενώ το μάσημα των φύλλων του μπορεί να έχει αντιεμετική δράση. Χρειάζεται προσοχή όσον αφορά το λάδι από το φλισκούνι γιατί θεωρείται δηλητηριώδες και δεν πρέπει να καταναλώνεται.

Το φλισκούνι είναι το πιο περιεκτικό είδος σε συστατικά του γένους της μέντας. Όσον αφορά τη σύστασή του, έχει βρεθεί ότι το αιθέριο έλαιο του περιέχει ρητίνες, ταννίνη, μενθόλη (Kokkini et al., 2011), ισομενθόλη (Stoyanova et al., 2003), πιπερόνη, πιπεριτενόνη, α-τερπινεόλη, p-μενθ-4-εν-3-όνη, συστατικά στα οποία αποδίδεται η αντισηπτική δράση του βοτάνου αλλά και η αντιβακτηριακή του δράση (κυρίως εναντίον Gram (+) βακτηρίων) (Mahboubi & Haghi, 2008). Σχετικά με το

φαινολικό του περιεχόμενο δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή στοιχεία. Επιπρόσθετα, έχουν γίνει έρευνες που αποδεικνύουν ότι το φλίσκουνι όπως και το χαμομήλι επιδεικνύουν αντιγενοτοξική δραστηριότητα και αντιοξειδωτική δράση, καθώς μπορούν να αναστείλλουν τη μεταλλαξιογόνο δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, ικανότητες που αποδίδονται στο φαινολικό τους περιεχόμενο (Romero-Jimenez et al., 2005).

1.1.2.13 Χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*)

Ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και το γένος *Matricaria*. Πρόκειται για το κοινό χαμομήλι, το οποίο φύεται στην ανατολική και δυτική Ευρώπη. Το όνομα του σημαίνει μήλο που είναι κάτω στο έδαφος. Είναι ποώδες αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό, το ύψος του δεν ξεπερνάει τα 35 εκατοστά και έχει διάρκεια ζωής το ένα έτος (μονοετές). Τα φύλλα του είναι δις ή



Εικόνα 1.22 *Matricaria chamomilla*

τρεις φτεροσχιδή και τα άνθη του, χρώματος λευκο-κίτρινο, κατανέμονται σε ταξιανθίες- κεφάλια που μοιάζουν ιδιαίτερα με αυτές τις μαργαρίτες. Ο βλαστός του είναι όρθιος, λείος και πολύκλαδος. Από το φυτό συλλέγονται τα άνθη όταν ανοίξουν καλά (Εικόνα 1.22).

Οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι γνωστές από την αρχαιότητα και ο ίδιος ο Ιπποκράτης το χρησιμοποιούσε για πολλές περιπτώσεις. Η χρήση του μπορεί να είναι και εξωτερική και εσωτερική. Όσον αφορά την εξωτερική χρήση, το χαμομήλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό μολυσμένων ματιών και πληγών του δέρματος (αντισηπτική δράση) ενώ όσον αφορά την εσωτερική χρήση, το χαμομήλι χρησιμοποιείται ως καταπραϋντικό του στομάχου, σε περιπτώσεις έλκους, για τον παροξυσμό του άσθματος, σε νευραλγίες, μυϊκές κράμπες, σπασμούς και ημικρανίες καθώς και για την καταπολέμηση της αϋπνίας χάρη στις ηρεμιστικές/ χαλαρωτικές ιδιότητες που έχει. Όταν το ρόφημα ή το αφέψημα του καταναλώνεται πριν το

φαγητό, μπορεί να ενισχύσει την όρεξη ενώ όταν καταναλώνεται μετά το φαγητό μπορεί να διευκολύνει την πέψη. Ακόμη, έχει φανεί από έρευνες ότι το χαμομήλι παρουσιάζει και ήπια αντιπηκτική δράση, μειώνει, δηλαδή, τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και παρουσιάζει συνεργιστική δράση με φάρμακα που χορηγούνται σε ασθενείς με καρδιοπάθεια ή κίνδυνο για καρδιακά εγκεφαλικά επεισόδια. Έχει τεκμηριωθεί, επίσης, η χρήση του ως αντιπυρετικό, ανθελμινθικό, αντιβακτηριδιακό, αντιφλεγμονώδες και διουρητικό. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να μη γίνεται υπέρμετρη χρήση του εσωτερικά καθώς ενδέχεται να προκληθούν παρενέργειες όπως ζαλάδα, κεφαλαλγία, αύξηση του καρδιακού ρυθμού και αϋπνία. Επιπλέον, οι ασθενείς που λαμβάνουν ηρεμιστικά ή υπνωτικά φάρμακα σε συνδυασμό με αφέψημα από χαμομήλι, πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί και να ενημερώνουν το θεράποντα ιατρό τους για τη χρήση που κάνουν καθώς είναι πιθανό το αφέψημα και τα φάρμακα να δρουν συνεργιστικά.

Από έρευνες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια σχετικά με το χαμομήλι, έχει βρεθεί ότι το εκχύλισμα του είναι πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι τα τερπενοειδή και τα φλαβονοειδή. Ειδικότερα, έχουν προσδιοριστεί οι ακόλουθες ουσίες: ιππουρικό οξύ (αντιφλεγμονώδης δράση), γλυκίνη (μειώνει τους μυϊκούς σπασμούς), χαμαζουλίνη, trans- β-φαρνεσίνη, βορνεόλη, δισαμπολένιο, λιμονένιο, βαλεριανικό οξύ, αμινοξέα, ταννίνες, κουμαρίνες (και ειδικότερα, (E)-2-β-D-γλυκοκυρανοσυλοξυ-4-μεθοξυ-κινναμωμικά οξέα) (Kovacik & Repcak, 2008), πολυσακχαρίτες, χολίνη, οξείδιο του καρβοφυλλενίου, εξαδεκανόλη, απιγενίνη, λουτεολίνη και κερκετίνη (Murti et al., 2012). Έχει αποδειχθεί από έρευνες ότι το α-δισαμπολένιο που περιέχεται στο χαμομήλι παρουσιάζει δράση κατά των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων ενώ η χαμαζουλίνη εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση (Kedzia, 1991) αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και επηρεάζει την πορεία των ελευθέρων ριζών (Rekka et al., 1996). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το υδατικό εκχύλισμα από χαμομήλι εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση εναντίον του *Helicobacter pylori* (Stamatis et al., 2003) καθώς και εναντίον Gram (+) βακτηρίων του γένους *Streptococcus*, και συγκεκριμένα εναντίον των *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus faecalis* *Streptococcus sanguis* (Owlia et al., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων Βοτάνων και Διαδικασία Παραλαβής Αφυδατωμένων Αφεψημάτων

Μελετήθηκαν 13 βότανα της Ελληνικής χλωρίδας. Όλα τα βότανα προέρχονταν από τη Νύβριτο Ηρακλείου Κρήτης με εξαίρεση το Σπαθόχορτο, το οποίο ήταν τυποποιημένο από το Σύλλογο Γυναικών Άνω Πορρόϊας του νομού Σερρών και το Μελισσόχορτο, το οποίο προερχόταν από βιολογικές καλλιέργειες στην Αιτωλοακαρνανία. Τα βότανα παραλήφθηκαν τυποποιημένα σε συσκευασίες των 250g.

Ο Πίνακας 1 δείχνει τα είδη βοτάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

Πίνακας 1: Βότανα

	Κοινή Ονομασία Βοτάνου	Επιστημονική Ονομασία Βοτάνου (Είδος, Γένος)	Οικογένεια
1	Αντωνάϊδα	<i>Origanum microphyllum</i>	Lamiaceae
2	Δενδρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae
3	Δίκταμο	<i>Origanum dictamnus</i>	Lamiaceae
4	Θρύμπα	<i>Satureja thymbra</i>	Lamiaceae
5	Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae
6	Μαντζουράνα	<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae
7	Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae
8	Σπαθόχορτο	<i>Hypericum perforatum</i>	Clusiaceae
9	Τσάι του Βουνού	<i>Sideritis syriaca</i>	Lamiaceae
10	Φασκόμηλο	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae
11	Φλισκούνι	<i>Mentha pulegium</i>	Lamiaceae
12	Χαμομήλι	<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae
13	Μελισσόχορτο	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae

Αντιδραστήρια- Όργανα

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Γυάλινη κανάτα βρασμού

Μεταλλικό νερό

Θερμαντική πλάκα

Γυάλινο χωνί

Διηθητικό χαρτί

Ογκομετρικός κύλινδρος 250mL

Ποτήρια ζέσεως 100mL

Parafilm

Βαθυκαταψύκτης -40° C

Συσκευή λυοφιλίωσης

Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα

Αναλυτική Πορεία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή και αφυδάτωση των αφεψημάτων ήταν ίδια για όλα τα βότανα. Αρχικά, ζυγίζονται 3g βοτάνου σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Λαμβάνονται 250mL μεταλλικού νερού ΖΑΓΟΡΙ με ογκομετρικό κύλινδρο και τοποθετούνται σε γυάλινο σκεύος βρασμού από βιοπυριτικό γυαλί (pyrex) μαζί με την ποσότητα βοτάνου (δείγματος) που αναφέρθηκε. Το γυάλινο σκεύος τοποθετείται σε προθερμασμένη θερμαντική πλάκα και απομακρύνεται από αυτήν 3min μετά από την έναρξη του βρασμού. Αφήνουμε το αφέψημα επί μερικά λεπτά προκειμένου να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και έπειτα το μεταφέρουμε για διήθηση σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250mL. Η απώλεια κατά το βρασμό εκτιμήθηκε ότι ανέρχεται στα 50mL περίπου. Εάν ο όγκος που παρατηρείται στον ογκομετρικό κύλινδρο μετά από τη διήθηση είναι μικρότερος από 200mL, γίνεται συμπλήρωση με κατάλληλο όγκο νερού. Ακολούθως, το αφέψημα μεταφέρεται σε πλαστικά δοχεία γνωστού όγκου (100mL), τα οποία καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε καταψύκτη των -80° C για 24h, μετά το πέρας των οποίων τα αφεψήματα τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης για 72h από όπου παραλαμβάνονται αφυδατωμένα. Προκειμένου τα

αποτελέσματα να διορθωθούν ως προς τα διαλυμένα άλατα του νερού, έγινε λυοφιλίωση και ίσου όγκου νερού σε πλαστικά δοχεία αντίστοιχα με εκείνα που τοποθετήθηκαν τα αφεψήματα.

Το στερεό υπόλειμμα κάθε αφεψήματος παραλαμβάνεται και αφού ζυγισθεί, τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα. Τα φιαλίδια τοποθετούνται για ψύξη στους -40°C υπό συνθήκες σκότους.

2.2 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων

2.2.1 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων για τον έλεγχο βιοδραστικότητας

Αντιδραστήρια- Όργανα

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 5mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής

Καλλιεργητικό υλικό RPMI -1640, με 20μM HEPES και L-γλουταμίνη, χωρίς NaHCO_3

Αυτόματες πιπέτες 100-1000μL και tips

Αποστειρωμένες σύριγγες 5mL

Αποστειρωμένα φίλτρα 0.20μm

Αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf χωρητικότητας 1,5mL

Καταψύκτης -20°C

Αναλυτική Πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή και για τα 13 βότανα. Αρχικά, τα δείγματα αποψύχονται σε σκοτεινό μέρος ενώ φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και το καλλιεργητικό υλικό. Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται 150-220mg από το κάθε δείγμα. Ανάλογα με τη ζυγισθείσα ποσότητα αφυδατωμένου αφεψήματος προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 200μg/μL. Ακολούθως, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη διαλυτοποίηση, ο δοκιμαστικός σωλήνας μεταφέρεται στη συσκευή Elmasonic S60, [77]

όπου πραγματοποιείται ανάδευση για 5min. Στη συνέχεια, με αποστειρωμένη σύριγγα των 5mL λαμβάνεται το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα. Προκειμένου το διάλυμα να αποστειρωθεί διέρχεται μέσω αποστειρωμένου πλαστικού φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.20μm και συλλέγεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf του 1,5mL και στη συνέχεια αποθηκεύεται στους -20°C.

2.2.2 Διαλυτοποίηση στερεού υπολείμματος αφεψημάτων για τον έλεγχο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας

Αντιδραστήρια- Όργανα

Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες των 5mL

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

Απιονισμένο νερό (dH₂O)

Αυτόματες πιπέτες 100-1000μL και tips

Φιαλίδια erpendorf του 1,5mL

Καταψύκτης -20° C

Αναλυτική Πορεία

Και εδώ, η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια για όλα τα βότανα. Τόσο τα δείγματα όσο και το απιονισμένο νερό (dH₂O) που χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση των βοτάνων φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα από κάθε δείγμα ώστε οι τελικές δόσεις να είναι 2,5 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng.

2.3 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Καλλιεργητικό υλικό RPMI -1640, με 20μM HEPES και L-γλουταμίνη, χωρίς NaHCO₃

Βόειος ορός FBS, πενικιλίνη- στρεπτομυκίνη

Αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 και 50mL

Αποστειρωμένες πιπέτες των 5-10mL, αποστειρωμένα tips

Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες 37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Ηπαρίνη

Καταψύκτης (-20° C), υπερκατάψυξη (-80° C)

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Αυτόματες πιπέτες (200-1000μL)

Διάλυμα Ficoll, 1mg/mL

Φωτονικό μικροσκόπιο

Αιμοκυττόμετρο

Διάλυμα κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue)

Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials)

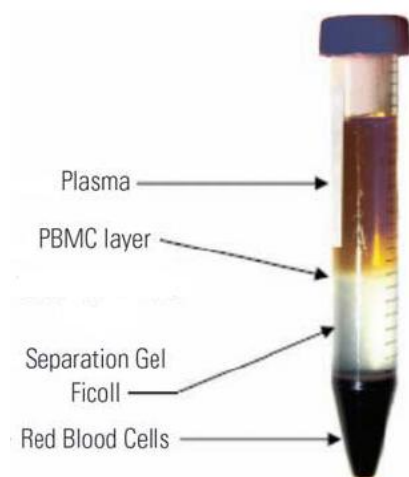
Ειδικό δοχείο ψύξης κυττάρων με ισοπροπανόλη

Ηπαρίνη

Αναλυτική Πορεία

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται αιμοληψία από υγιείς εθελοντές ηλικίας 22-50 ετών προκειμένου να παραληφθεί αίμα από το οποίο θα απομονωθούν τα μονοπύρηνα κύτταρα. Η απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος γίνεται με τη μέθοδο φυγοκεντρικού διαχωρισμού με διάλυμα Ficoll 1mg/mL. Ειδικότερα, σε σωλήνες φυγοκέντρωσης Falcon των 50mL προστίθεται διάλυμα Ficoll ίσου όγκου προς τον όγκο αίματος. Με σταθερές και προσεκτικές κινήσεις γίνεται επίστρωση του αίματος πάνω από το διάλυμα Ficoll και το δείγμα τοποθετείται για φυγοκέντρωση (συνθήκες φυγοκέντρωσης: 1800rpm, 20min, 20° C, χωρίς επιτάχυνση και χωρίς φρένο). Στη συνέχεια, λαμβάνεται η στοιβάδα των

PBMCs και μεταφέρεται σε falcon των 15mL για να απομακρυνθούν υπολείμματα Ficoll, το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό (Complete Medium- 90% RPMI-10% βόειο ορό και αντιβιοτικά Πενικιλίνη 100U/mL και Στρεπτομύκινη 100μg/mL Streptomycin). Το δείγμα τοποθετείται για φυγοκέντρηση επί 5min στις 1800rpm στους 20° C . Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα πλένονται άλλη μια φορά με καλλιεργητικό υλικό (για 5min στις 1800rpm στους 20° C).



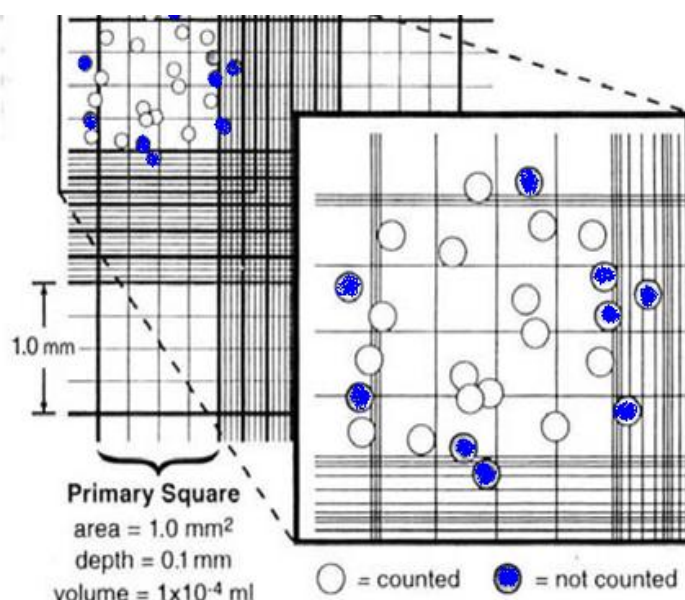
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση του διαχωρισμού των συστατικών του αίματος έπειτα από φυγοκέντρηση.

2.3.1 Άμεση χρήση κυττάρων για έλεγχο της βιοδραστικότητας των αφεψημάτων

Στην περίπτωση που τα κύτταρα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα, γίνεται διάσπαση του κυτταρικού ιζήματος που έχει προκύψει από τη φυγοκέντρηση, προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού και έπειτα πραγματοποιείται αραίωση με διάλυμα Trypan Blue σε eppendorf του 1,5mL. Ακολούθως, με τη χρήση αιμοκυττόμετρου και φωτονικού μικροσκοπίου γίνεται μέτρηση του αριθμού των υπαρχόντων κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 που ακολουθεί.

2.3.2 Ψύξη- Αποθήκευση κυττάρων- Απόψυξη

Στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν χρησιμοποιούνται αμέσως, απομακρύνεται το υπερκείμενο, γίνεται διάσπαση του κυτταρικού ιζήματος και προστίθεται 1mL διαλύματος ψύξης, το οποίο αποτελείται από καλλιεργητικό υλικό με 20% βόειο ορό FBS και 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Από το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρεται 1mL σε κρυογονικά φιαλίδια (cryovials), αποθηκεύονται στους -80°C σε κουτί ισοπροπανόλης και στη συνέχεια μεταφέρονται σε υγρό άζωτο (-196°C). Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται φέροντας το κρυογονικό φιαλίδιο από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις το περιεχόμενο υγροποιηθεί, αραιώνεται ($\times 7-8$ φορές) με θρεπτικό υλικό σε falcon των 15mL και φυγοκεντρείται για 5min σε 1800 rpm στους 20°C εις διπλούν.



Εικόνα 2.2 : Απεικόνιση του τρόπου μέτρησης των κυττάρων (PBMCs) σε φωτονικό μικροσκόπιο με τη χρήση διαλύματος Trypan Blue.

Παραπάνω παρατίθεται η εικόνα (Εικόνα 2.2) από το φωτονικό μικροσκόπιο μετά από την επίδραση με διάλυμα Trypan Blue σε μονοπύρηνα προκειμένου να γίνει η μέτρηση αυτών μετά τη διαδικασία απομόνωσης τους. Οι λευκοί κύκλοι αντιπροσωπεύουν τα μονοπύρηνα που έχουν επιβιώσει και τα οποία μετράμε, ενώ οι κυανοί κύκλοι αντιπροσωπεύουν τα μονοκύτταρα που δεν επιβίωσαν. Για τον ακριβή αριθμό κυττάρων εφαρμόζεται η παρακάτω εξίσωση:

«% ποσοστό βιώσιμων = $100 \times \text{νεκρά κύτταρα (κυανά)} / \text{συνολικά μετρηθέντα κύτταρα}$ »

2.4 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηρότητας των βοτάνων στις λιποπρωτεΐνες ορού

2.4.1 Παραλαβή ορού

Αντιδραστήρια- Όργανα

Falcon χωρίς ηπαρίνη (κόκκινο σωληνάκι)

Φυγόκεντρος

Αναλυτική Πορεία

Πραγματοποιείται αιμοληψία από υγιείς εθελοντές 22-50 ετών. Το αίμα (5mL) καθιζάνει μόνο του (τα έμμορφα συστατικά του καθιζάνουν) για 30min περίπου ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 10min στις 3000rpm και στους 20° C.

Αντιδραστήρια- Όργανα

Ένυδρος Θεικός Χαλκός ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, MW= 249,68)

Απιονισμένο Νερό (dH_2O)

Δοκιμαστικός σωλήνας 5mL

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS

96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Διάλυμα ορού

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) – 245nm

Αρχή της Μεθόδου

Με το διάλυμα του θειικού χαλκού προκαλείται οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Η αντίχρευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245nm. Καταγράφεται [82]

φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των διαλυτοποιημένων αφεψημάτων στον ορό (LagTime).

Αναλυτική Πορεία

Αρχικά παρασκευάζουμε το μητρικό διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας CuSO_4 συγκέντρωσης 200μM με αραιώση 1:100 του μητρικού διαλύματος CuSO_4 με dH_2O . Ακολούθως, παρασκευάζεται το μίγμα από το διάλυμα εργασίας CuSO_4 και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS με τελική συγκέντρωση 10μM (αραιώση 1:20). Γίνεται αραιώση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS. Οι δόσεις που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν από τα πυκνά διαλύματα των αφεψημάτων ήταν: 2,5 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή και για τα 13 βότανα. Αρχικά, τοποθετούνται στο ειδικό UV 96-well plate τα 20μL από το αραιωμένο δείγμα ορού. Έπειτα, τοποθετείται το 1μL από το διαλυτοποιημένο δείγμα αφεψήματος και, τέλος, προστίθενται τα 230μL το μίγματος CuSO_4 και PBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στο Elisa Reader για 4 τουλάχιστον ώρες (μετρήσεις λαμβάνονται κάθε 2 λεπτά) και σε τελικό στάδιο λαμβάνουμε γραφήματα από τα οποία προκύπτει η μέτρηση του LagTime (χρόνος αντίστασης ορού στην οξείδωση).

2.5 Μέτρηση των επιπέδων της Γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

2.5.1 Επίδραση στα PBMCs με διαλυτοποιημένα αφεψήματα

Αντιδραστήρια- Όργανα

Πολυστυρενικό τρυβλίο των 24 βοθρίων

Καλλιεργητικό υλικό RPMI

Πιπέτες και tips

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

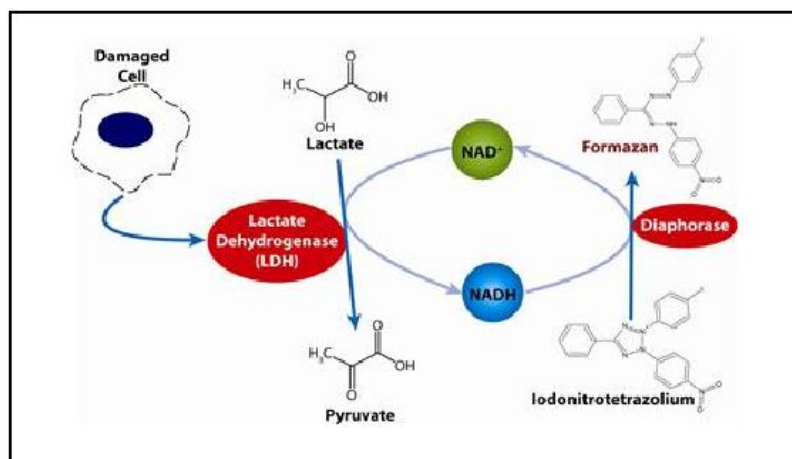
Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37° C, 5% CO_2 , 95% υγρασία)

Αναλυτική πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3, τα κύτταρα μετρούνται και μοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 24 βοθρίων. Συγκεκριμένα, για τις ανάγκες του πειράματος μετρούνται 10^6 κύτταρα/ βοθρίο. Στη συνέχεια, προστίθεται καλλιεργητικό υλικό RPMI μέχρι τελικού όγκου 1mL. Ακολούθως, προστίθεται στα κύτταρα κατάλληλος όγκος διαλυτοποιημένου αφεψημάτος για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση των αφεψημάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων στις ακόλουθες δόσεις: 200, 500, 1000 και 2000μg. Το πείραμα επαναλαμβάνεται εις διπλούν. Τα επίπεδα της LDH μετρούνται και σε κύτταρα στα οποία δεν έχουμε επιδράσει με δείγματα βοτάνων. Διακρίνονται 3 ομάδες: (α) low control, (β) high control και (γ) αυτή στην οποία προσθέτουμε διαλυτοποιημένα αφεψημάτα στα κύτταρα, από την οποία θα εκτιμήσουμε τα επίπεδα της LDH λόγω πιθανής τοξικότητας από αυτά. Τα πολυστυρενικά τρυβλία που περιέχουν τα κύτταρα τοποθετούνται για επώαση επί 24 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία).

Αρχή της Μεθόδου

Η γαλακτική αφυδρογονάση οξειδώνει το γαλακτικό οξύ προς NADH, το οποίο στη συνέχεια μέσω ειδικής αντίδρασης με συγκεκριμένο παράγοντα/αντιδραστήριο του kit (WST substrate mix) σχηματίζει ένωση κίτρινου χρώματος που απορροφά στα 450nm. Η ένταση του χρώματος συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό κυττάρων που έχουν υποστεί λύση, δηλαδή όσο πιο έντονο είναι το κίτρινο/ πορτοκαλί χρώμα τόσο περισσότερα κύτταρα έχουν θανατωθεί. Ο τρόπος δράσης της LDH παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)

Αντιδραστήρια- Όργανα

Εξειδικευμένο kit για τη μέτρηση της LDH

Θάλαμοι κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Πολυστυρενικά τρυβλία των 24 βοθρίων (24-well plate)

Καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640, με 20μM HEPES και L-γλουταμίνη, χωρίς NaHCO_3

Διαλύματα αφυδατωμένων αφεψημάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις

Πιπέτες και tips (2-1000μL)

Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37° C, 5% CO_2 , 95% υγρασία)

Φιαλίδια erppendorfs του 1,5mL

Φυγόκεντρος

Δοκιμαστικός σωλήνας 15mL

Πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων (96-well plate)

Φωτόμετρο ELISA(Elisa Reader)

Αναλυτική Πορεία

Μετά από την επώαση των 24h, συλλέγεται το περιεχόμενο των βοθρίων σε φιαλίδια erppendorfs του 1,5mL και ακολούθως τοποθετούνται για φυγοκέντρωση στα 600g (rcf) για 10min σε θερμοκρασία 20° C προκειμένου να καταβυθιστούν τα κύτταρα. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση ακολουθεί διαφορετικός χειρισμός για τα high

control (υγιή κύτταρα) από εκείνον που ακολουθείται για την ομάδα των low control και τα δείγματα. Ειδικότερα:

- Για τα high control, μετά από τη φυγοκέντρωση απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100μL καλλιεργητικό υλικό RPMI και 10μL Cell Lysis Solution. Προκειμένου να επιτευχθεί η απόλυτη λύση των κυττάρων τα φιαλίδια eppendorfs που περιέχουν τα high control τοποθετούνται για ανάδευση στο sonicator για 2 min. Μεταφέρονται 10μL από το περιεχόμενο των φιαλιδίων eppendorf σε πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων το οποίο περιέχει 100μL από το LDH Reaction Mix και ακολουθεί επώαση για 30min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.
- Για την ομάδα των low control και τα δείγματα, μεταφέρονται 10μL από το υπερκείμενο σε πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων, το οποίο περιέχει 100μL από το LDH Reaction Mix και ακολουθεί επώαση για 30min προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm στο φωτόμετρο ELISA Reader.

Με τη χρήση του τύπου

$$\frac{\text{Test Sample- Low Control}}{\text{High Control- Low Control}} \times 100$$

προκύπτει το ποσοστό(%) της κυτταροτοξικότητας από τα εκχυλίσματα των βοτάνων και επομένως, το ποσοστό Βιωσιμότητας (%) προκύπτει αφαιρώντας από το σύνολο (100%) των κυττάρων το ποσοστό κυτταροτοξικότητας.

2.6 Μέτρηση των επιπέδων του προφλεγμονώδους Παράγοντα Νέκρωσης των Όγκων (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-α)

2.6.1 Διέγερση των κυττάρων και επίδραση με τα διαλύματα των αφεψημάτων

Αντιδραστήρια- Όργανα

Πολυστυρενικό τρυβλίο των 24 βοθρίων

Καλλιεργητικό υλικό RPMI

Πιπέτες και tips

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (LAMINAR FLOW) με λάμπες UV

Τοξίνη LPS από το βακτήριο *Escherichia coli*

Επωαστικός θάλαμος (συνθήκες: 37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία)

Αναλυτική Πορεία

Με την πορεία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3, τα κύτταρα μετρούνται και μοιράζονται σε εξειδικευμένα πολυστυρενικά τρυβλία των 24 βοθρίων. Συγκεκριμένα, για τις ανάγκες του πειράματος τοποθετούνται 10⁶ κύτταρα/ βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλυτοποιημένου αφεψήματος (παράγραφος 2.2.1) για να μελετηθούν οι δόσεις 500, 200, 100 και 50μg. Στη συνέχεια, προστίθεται στα κύτταρα που έχουμε επιδράσει με βότανα 1μL (2000ng/mL, δηλαδή 2μg/mL) από την τοξίνη LPS έτσι ώστε να διεγείρουμε την έκκριση των κυτταροκινών που θα μελετήσουμε. Σε κάθε βοθρίο προστίθεται κατάλληλος όγκος καλλιεργητικού υλικού έτσι ώστε ο τελικός όγκος σε καθένα από αυτά να είναι 1mL. Τα πολυστυρενικά τρυβλία που περιέχουν τα κύτταρα με τα αφεψήματα τοποθετούνται για επώαση για 24 ώρες (37° C, 5% CO₂, 95% υγρασία).

Αντιδραστήρια- Όργανα

Εξειδικευμένο Duoset ELISA kit για τη μέτρηση του TNF-α

96-well plate (high-binding) (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Ειδικό κάλυμμα για το plate

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (non-sterilized)

Πιπέτες και tips (2-1000μL)

Πολυκάναλη πιπέτα (20-200μL)

Απιονισμένο νερό

Διάλυμα αφυδατωμένων αφεψημάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις/ αραιώσεις από το πυκνό διάλυμα

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Ο TNF-α προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα anti-TNF-α, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής του προσδεδεδεμένου TNF-α στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο για την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών, προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

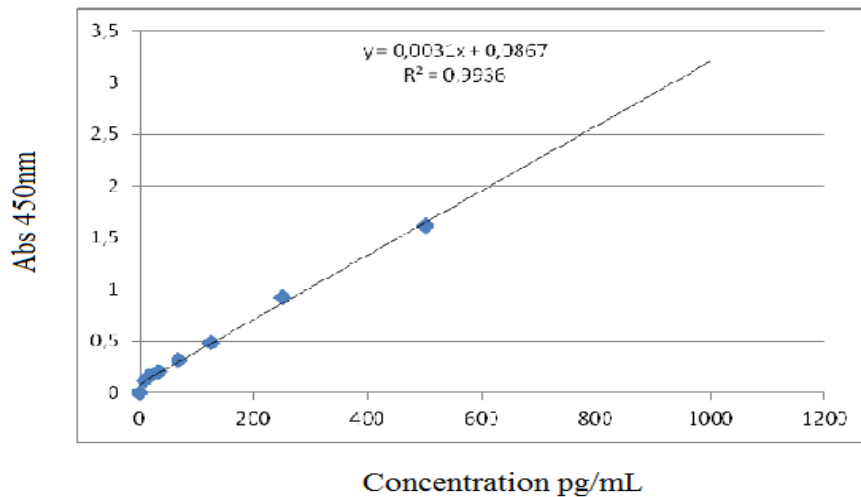
Αναλυτική Πορεία

Τα επίπεδα του TNF-α σε υπερκείμενο καλλιέργειας μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται τα αντιδραστήρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο αρχικό στάδιο, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά από 24ωρη επώαση, συλλέγεται το περιεχόμενο των βοθρίων, φυγοκεντρείται για 2 min στα 600g και στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο (δείγματα). Στα δείγματα γίνεται αραιώση 1:7. Στις αντίστοιχες θέσεις στο πολυστυρενικό τρυβλίο των 96 βοθρίων προστίθεται αρχικά 100μL αραιωμένου με διάλυμα PBS μονοκλωνικού αντισώματος (capture antibody), όπως φαίνεται στο στάδιο 1 της Εικόνας 2.3 και το τρυβλίο αφήνεται για επώαση όλη νύχτα (περίπου 15ώρες). Σε επόμενο στάδιο, γίνεται απομάκρυνση του υπερκειμένου και ξέπλυμα του τρυβλίου με διάλυμα πλύσης 4 φορές. Μετά από το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 300μL διαλύματος Reagent Diluent σε κάθε βοθρίο. Το τρυβλίο σκεπάζεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μια ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πάλι πλύσιμο του τρυβλίου 4 φορές και αφού

απομακρυνθεί η υγρασία, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων. Αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ωρών, το τρυβλίο πλένεται και πάλι με διάλυμα πλύσης 4 φορές. Γίνεται προσθήκη 100μL του πολυκλωνικού αντισώματος (detection antibody), όπως φαίνεται στο στάδιο 2 της εικόνας 2.3 και αφήνεται πάλι για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Ακολουθεί και πάλι απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα με το διάλυμα πλύσης 4 φορές. Μετά από το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνουμε την υγρασία και προστίθενται 100μL του ενζύμου Streptavidin-HRP σε κάθε βοθρίο. Ακολουθεί επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος και προστίθενται 100μL από το Substrate Solution (Color Reagent A / Color Reagent B σε αναλογία 1:1). Ακολουθεί και πάλι επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Μετά από το τέλος της επώασης γίνεται προσθήκη 50μL διαλύματος τερματισμού (Stop Solution), όπως στο στάδιο 3 της Εικόνας 2.3 και πραγματοποιείται απευθείας μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm στο Eliza Reader. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/ mL, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον TNF-a.

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΙΑ ΤΟΝ TNF-a

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα TNF-a (2000 pg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 1000, 500, 250, 125, 62,5 και 31,2 pg/mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi = f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της TNF-a σε pg/mL και ψ η απορρόφηση στα 450nm, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2.1.



Γράφημα 2.1: Πρότυπη καμπύλη του TNF-α.

2.7 Μέτρηση των επιπέδων της ιντερλευκίνης 6 (IL-6)

2.7.1 Διέγερση των κυττάρων και επίδραση με τα διαλύματα των αφεψημάτων

Η πορεία που ακολουθείται είναι όμοια με εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.1.

Αντιδραστήρια- Όργανα

Εξειδικευμένο DuoSet ELISA kit για τη μέτρηση της IL-6

96-well plate (high-binding) (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Ειδικό κάλυμμα για το plate

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (non-sterilized)

Πιπέτες και tips (2-1000μL)

Πολυκάναλη πιπέτα (20-200μL)

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader)

Αρχή της Μεθόδου

Η IL-6 προσδένεται αρχικά σε μονοκλωνικό αντίσωμα anti-IL-6, ενώ στη συνέχεια για τον ανοσοπροσδιορισμό προστίθεται πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτής της προσδεμένης IL-6 στο μονοκλωνικό αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο για την

απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνών, προστίθεται υπόστρωμα και λαμβάνει χώρα χρωματομετρική αντίδραση. Το προϊόν της αντίδρασης απορροφά στα 450nm.

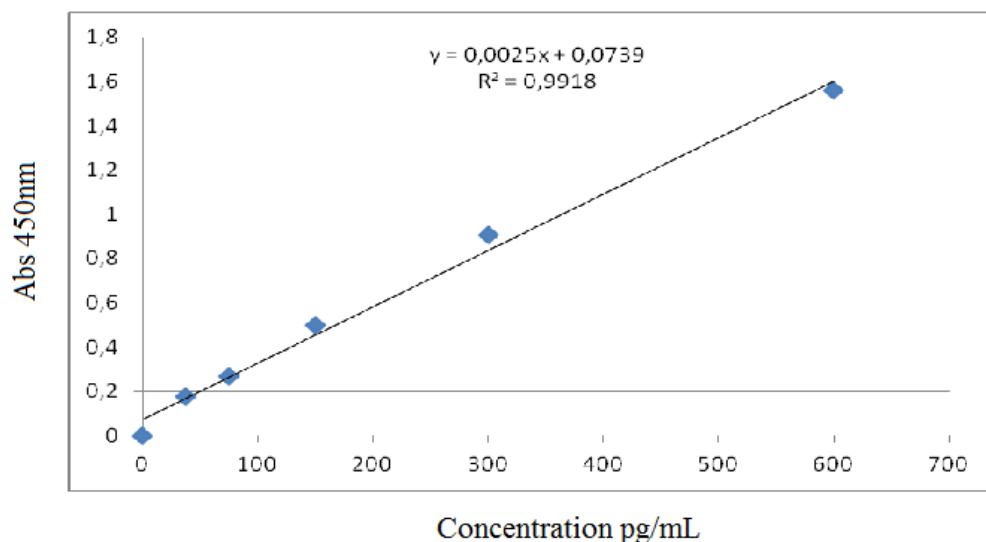
Αναλυτική Πορεία

Τα επίπεδα της IL-6 σε υπερκείμενο καλλιέργειας μετρώνται σε ELISA φωτόμετρο με χρήση εξειδικευμένου sandwich kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας. Αρχικά προετοιμάζονται τα αντιδραστήρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο αρχικό στάδιο, τα δείγματα και τα πρότυπα σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά από 24ωρη επώαση, συλλέγεται το περιεχόμενο των βοθρίων, φυγοκεντρείται για 2 min στα 600g και στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο (δείγματα). Στα δείγματα γίνεται αραίωση 1:90. Στις αντίστοιχες θέσεις στο τρυβλίο επώασης προστίθεται αρχικά 100μL αραιωμένου με διάλυμα PBS μονοκλωνικού αντισώματος (capture antibody), όπως φαίνεται στο στάδιο 1 της Εικόνας 2.3 και το τρυβλίο αφήνεται για επώαση επί 15ώρες. Σε επόμενο στάδιο, γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα του τρυβλίου με διάλυμα πλύσης 4 φορές. Μετά από το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνεται κάθε ίχνος υγρασίας και προστίθενται 300μL διαλύματος Reagent Diluent σε κάθε βοθρίο. Το τρυβλίο σκεπάζεται με το ειδικό κάλυμμα και αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μια ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πάλι πλύσιμο του τρυβλίου 4 φορές και αφού απομακρυνθεί η υγρασία, γίνεται προσθήκη των δειγμάτων. Αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά από το πέρας των 2 ωρών, το τρυβλίο πλένεται και πάλι με διάλυμα πλύσης 4 φορές. Γίνεται προσθήκη 100μL του πολυκλωνικού αντισώματος (detection antibody), όπως στο στάδιο 2 της Εικόνας 2.3 και αφήνεται πάλι για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Ακολουθεί και πάλι απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα με το διάλυμα πλύσης 4 φορές. Μετά από το τελευταίο πλύσιμο απομακρύνουμε την υγρασία και προστίθενται 100μL του ενζύμου Streptavidin-HRP σε κάθε βοθρίο. Ακολουθεί επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλυσίματος και προστίθενται 100μL από το Substrate Solution (Color Reagent A / Color Reagent B σε αναλογία 1:1). Ακολουθεί και πάλι επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Μετά από το τέλος της επώασης γίνεται προσθήκη 50μL διαλύματος τερματισμού (Stop Solution), όπως στο στάδιο 3 της Εικόνας 2.3 και

πραγματοποιείται απευθείας μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm στο Elisa Reader. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε pg/mL, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την IL-6.

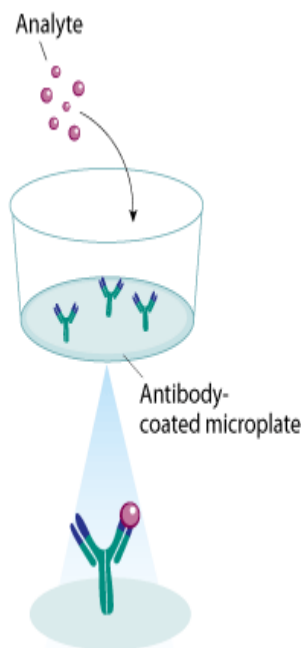
ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ IL-6

Για την καμπύλη αναφοράς γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα από μητρικό διάλυμα IL-6 (2000 pg/mL). Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι 1000, 500, 250, 125, 62,5 και 31,2 pg/mL. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi = f(x)$, όπου x η συγκέντρωση της IL-6 σε pg/mL και ψ η απορρόφηση στα 450nm, όπως φαίνεται στο γράφημα 2.2.

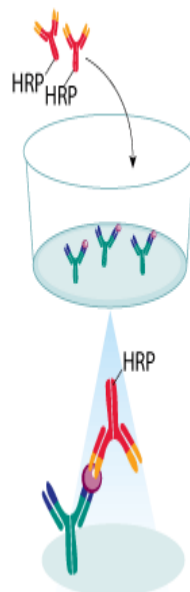


Γράφημα 2.2: Πρότυπη καμπύλη της IL-6.

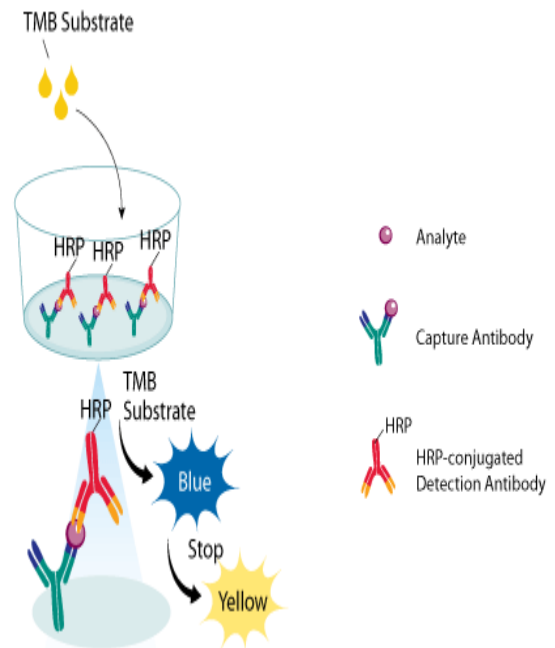
Στάδιο 1



Στάδιο 2



Στάδιο 3



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων που λαμβάνουν χώρα για τη μέτρηση του TNF-a και της IL-6.

2.8 Στατιστική Ανάλυση- Επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 18.00. Λόγω κανονικής κατανομής του πληθυσμού (Kolmogorov-Smirnov test), οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το Bonferroni (≤ 7 ομάδες σύγκρισης). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Παραλαβή στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων

Πρώτο στάδιο κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η παρασκευή των ροφημάτων των προς μελέτη βοτάνων και ακολούθως η παραλαβή του στερεού υπολείμματος αυτών με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Στον Πίνακα 3.1 που ακολουθεί παρουσιάζεται η απόδοση των αφεψημάτων των βοτάνων σε στερεό υπόλειμμα.

Πίνακας 3.1: Απόδοση αφεψημάτων σε στερεό υπόλειμμα ανά κούπα (200mL):

Βότανο	Μάζα αφυδατωμένου ροφήματος (mg)/ κούπα (200mL)
Αντωνιάδα	368
Δενδρολίβανο	97
Δίκταμο	434
Θρύμπα	436
Θυμάρι	442
Μαντζουράνα	496
Μελισσόχορτο	900
Ρίγανη	573
Σπαθόχορτο	625
Τσάι του Βουνού	387
Φασκόμηλο	192
Φλισκούνι	407
Χαμομήλι	662

Όπως φαίνεται από τα στοιχεία του παραπάνω Πίνακα, το βότανο το οποίο παρουσίασε τη μεγαλύτερη απόδοση σε στερεό υπόλειμμα μετά τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης του αφεψήματος του ήταν το Μελισσόχορτο και μάλιστα με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα βότανα (900mg/ 200mL). Δεύτερο σε απόδοση ήταν το Χαμομήλι (660mg/ 200 mL) και ακολούθησε το αφέψημα από το Σπαθόχορτο (625mg/ 200mL). Αντίθετα, το βότανο του οποίου η απόδοση σε στερεό [95]

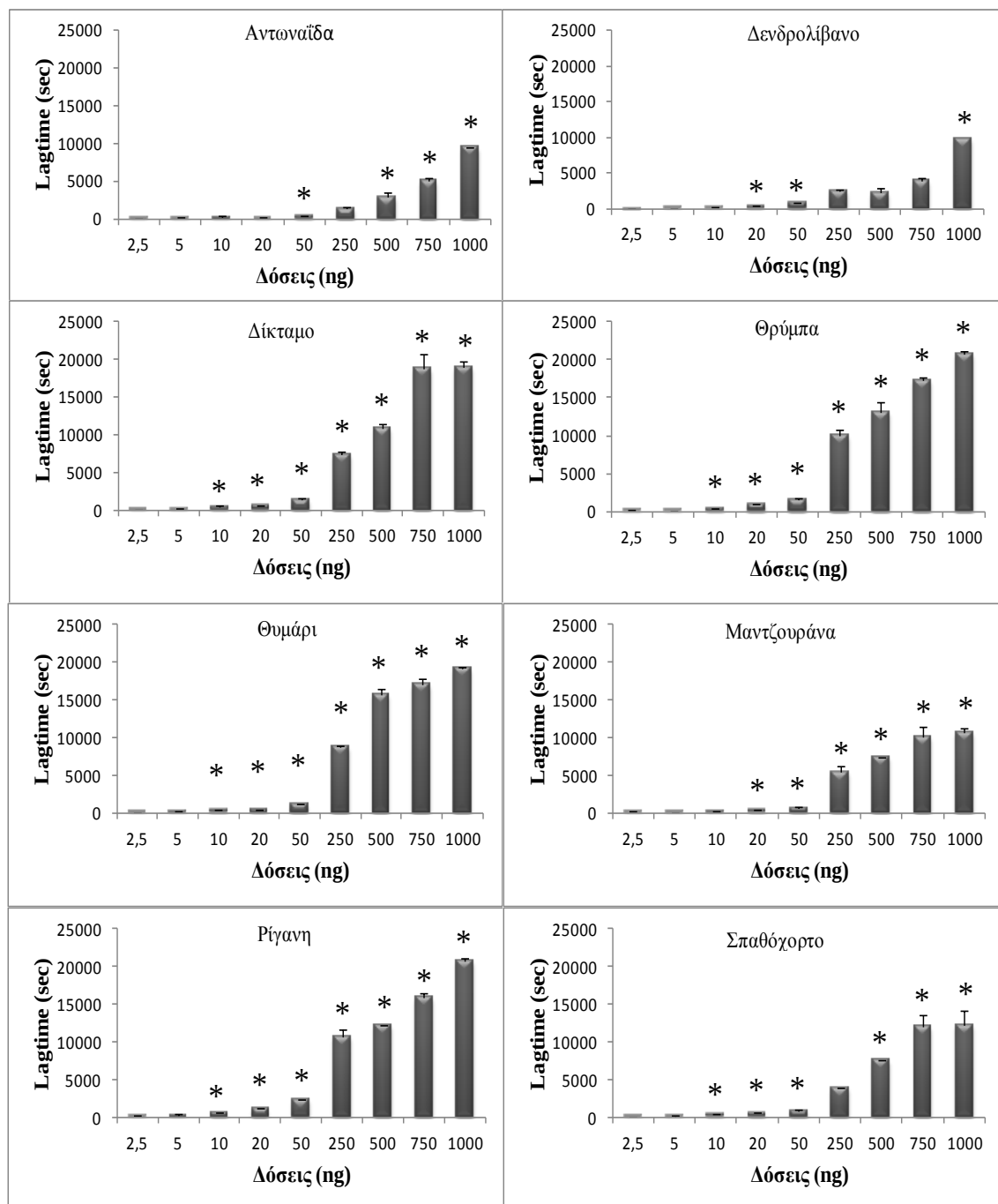
υπόλειμμα είχε τη μικρότερη τιμή ήταν το Δενδρολίβανο (97mg/ 200mL) και ακολουθεί το Φασκόμηλο (192mg/ 200mL). Τα υπόλοιπα βότανα σημείωσαν παρόμοιες τιμές απόδοσης.

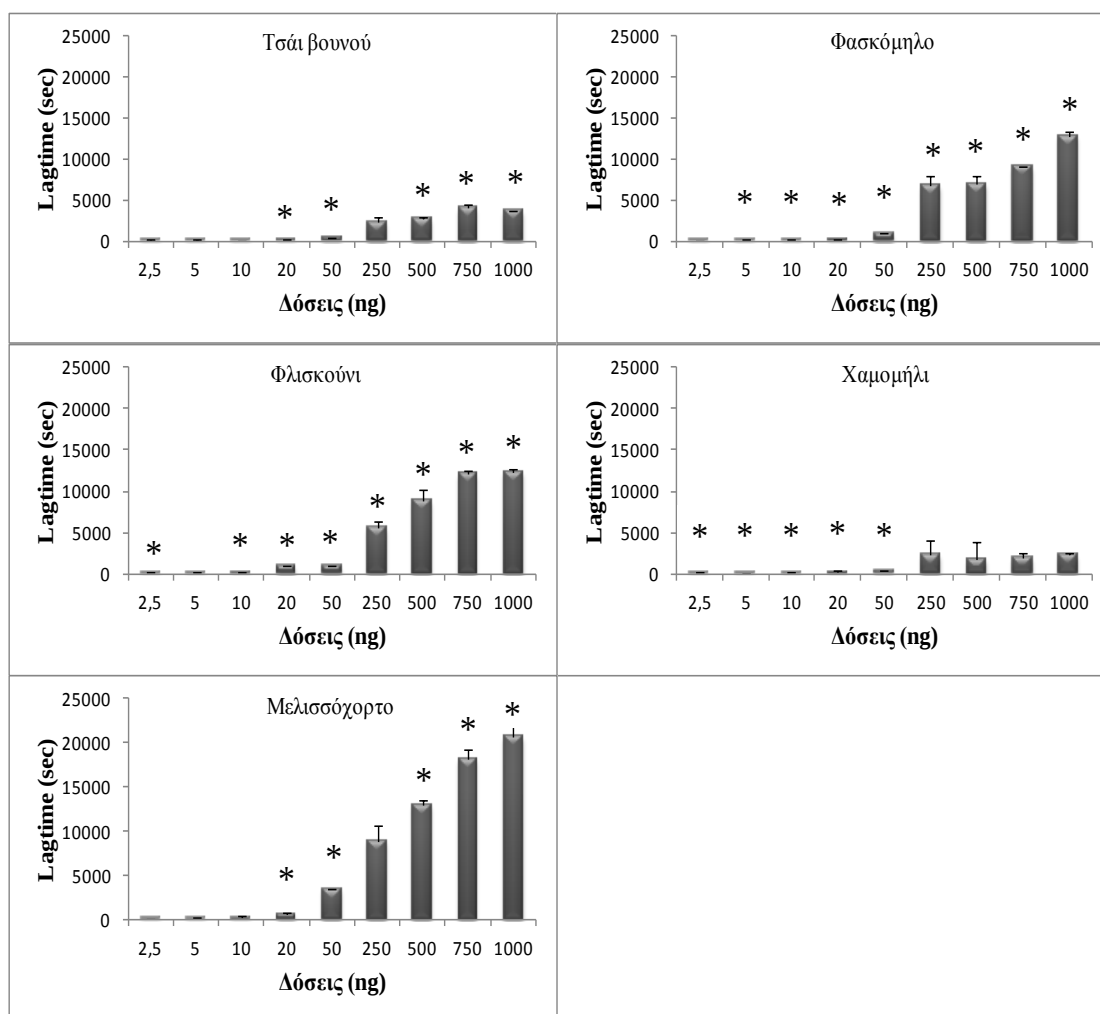
Στην παρούσα εργασία ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των βοτάνων ήταν το νερό, προκειμένου τα εκχυλίσματα-αφεψήματα να προσομοιάζουν κατά το δυνατόν με τα ροφήματα που παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται από τους καταναλωτές κατά τον παραδοσιακό τρόπο. Ωστόσο, βιβλιογραφικά, εκτός από το νερό, που είναι ο διαλύτης που έχει μελετηθεί λιγότερο, (*Triantaphyllou et al., 2001 & Vgi et al., 2005 & Kiselova et al., 2006*). έχουν αναφερθεί και άλλες μέθοδοι για την εκχύλιση των συστατικών των βοτάνων, στις οποίες χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, συνηθέστερα η αιθανόλη (*Djeridane et al., 2006 & Conforti et al., 2011*) ή η μεθανόλη (*Proestos et al., 2005 & Shan et al., 2005*). Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την απόδοση των φυτών/ βοτάνων σε στερεό υπόλειμμα. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη, τόσο μειώνεται η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (*Nackz & Shahidi, et al., 2006*). Επομένως, η εκχύλιση με νερό αναμένεται να οδηγεί σε μικρότερη απόδοση στερεού υπολείμματος συγκριτικά με τις αντίστοιχες μεθόδους με οργανικούς διαλύτες λόγω αυξημένης πολικότητας του μορίου του νερού. Ωστόσο, η απόδοση επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες που αφορούν στο ίδιο το βότανο, όπως είναι η κατάσταση του βοτάνου κατά τη συλλογή, ο χρόνος αποθήκευσής του πριν τη χρήση, η διάρκεια εκχύλισης, η ποσότητα βοτάνου που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση καθώς και η περιεκτικότητα αυτού σε φυτοχημικά (*Nackz & Shahidi, et al., 2006*).

3.2 Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.3.2, η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών και κατ' επέκταση στην πρόκληση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα των αφεψημάτων των βοτάνων να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) του ορού, προκειμένου να

τεκμηριωθεί κάποια πιθανή ευεργετική δράση αυτών σχετικά με την αθηρωματική νόσο. Στα διαγράμματα 3.1 παρουσιάζεται η επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στην καθυστέρηση της έναρξης της οξείδωσης της LDL, που εκφράζεται μέσω της επιμήκυνσης του Lagtime.





Διάγραμμα 3.1: Επίδραση των αφεψημάτων στο χρόνο οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας του ορού έπειτα από επώαση 24h. Ο (*) δηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα της αύξησης του Lagtime ($p < 0,05$). Οι τιμές είναι ο $\mu \pm S.D$ δύο πειραμάτων.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα παραπάνω διαγράμματα, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη αύξηση στο χρόνο οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας προκάλεσαν τα αφεψήματα από τη Ρίγανη, το Μελισσόχορτο και τη Θρύμπα στη δόση των 1000ng καθώς και το Δίκταμο στη δόση των 750ng. Όλα τα βότανα προκάλεσαν αύξηση στο χρόνο οξείδωσης της LDL, επιβράδυναν δηλαδή το ρυθμό με τον οποίο η LDL του ορού οξειδώνεται παρουσία Cu^{2+} . Συγκεκριμένα, για το Δίκταμο βρέθηκε ότι όλες οι δόσεις αυξάνουν το χρόνο οξείδωσης με εξαίρεση τις δύο μικρότερες, δηλαδή αυτές των 2,5ng και 5ng, ενώ για το Φασκόμηλο παρατηρήθηκε ότι μόνο η μικρότερη από τις δόσεις δεν προκαλεί αύξηση. Επιπλέον, για τα αφεψήματα από τη Θρύμπα, το Θυμάρι και τη Ρίγανη παρατηρήθηκε μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση του χρόνου οξείδωσης της LDL η οποία [98]

ήταν στατιστικά σημαντική με εξαίρεση τις δόσεις των 2,5ng και 5ng. Δοσοεξαρτώμενη αύξηση παρατηρήθηκε και έπειτα από την επίδραση με αφέψημα από Μαντζουράνα και Φλισκούνι (με εξαίρεση τη δόση των 5ng), ωστόσο η αύξηση του Lagtime ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα της Θρύμπας, του Θυμαριού, της Ρίγανης και του Μελισσόχορτου. Κατά την επίδραση με το αφέψημα Μαντζουράνας οι τρεις μικρότερες δόσεις δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Όσον αφορά στο Μελισσόχορτο, δοσοεξάρτηση παρατηρήθηκε ειδικότερα για τις τρεις μεγαλύτερες δόσεις αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση έδωσαν και οι δόσεις των 20ng και 50ng. Έπειτα από την επίδραση με το αφέψημα από το Τσάι του Βουνού σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση, όμως γενικά η αύξηση του Lagtime ήταν σε μικρά επίπεδα ενώ τα αποτελέσματα για το Φασκόμηλο έδειξαν ότι μόνο οι μικρές δόσεις (2,5ng, 5ng, 10ng, 20ng και 50ng) προκάλεσαν μικρή αύξηση, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, αξιοσημείωτη αύξηση του Lagtime προκάλεσαν και τα αφεψήματα Αντωνάϊδας, Δενδρολίβανου και Σπαθόχορτου όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε όλες τις δόσεις.

Έχει πραγματοποιηθεί πλήθος ερευνών προκειμένου να εντοπιστούν τρόποι με τους οποίους μπορεί να ενισχυθεί ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός του οργανισμού εναντίον των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες που συμβάλλουν τα μέγιστα στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης (*Hiroi et al., 1999*). Η αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας ή η αύξηση του χρόνου που αυτές χρειάζονται μέχρι να οξειδωθούν, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συμβάλλει στην αποτροπή ή την καθυστέρηση εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (*Dorman et al., 2003 & Singh & Jialal, 2006*). Τα συστατικά των βοτάνων που θεωρούνται υπεύθυνα για την επιβράδυνση του χρόνου οξείδωσης της LDL και τα οποία έχουν μελετηθεί αρκετά είναι οι πολυφαινόλες. Πιο συγκεκριμένα, οι *Dorman et al* (2003) έδειξαν ότι η επίδραση με εκχυλίσματα από Ρίγανη, Δενδρολίβανο, Φασκόμηλο και Θυμάρι είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της οξείδωσης της LDL παρουσία χαλκού και την επιμήκυνση του χρόνου οξείδωσης της. Η δράση αυτή αποδόθηκε κυρίως στην παρουσία του ροσμαρινικού οξέος αλλά και στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των συγκεκριμένων βοτάνων (*Dorman et al., 2003*). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη στην οποία ερευνήθηκε τόσο το φαινολικό περιεχόμενο όσο και η αντιοξειδωτική δράση του Θυμαριού, του Φασκόμηλου και της Μαντζουράνας,

υποστήριξε ότι το μεθανολικό εκχύλισμά τους παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία αποδόθηκε σε συστατικά όπως το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το κινναμωμικό οξύ, το φερουλικό οξύ, η απιγενίνη, η κερκετίνη και η λουτεολίνη, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες ενώ το Θυμάρι αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει την πιο ισχυρή δράση (Roby *et al.*, 2013). Επίσης δραστικές θεωρούνται και οι ταννίνες, οι κατεχίνες και το γαλλικό οξύ (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000). Μια άλλη έρευνα στην οποία μελετήθηκε το Δενδρολίβανο αξιολόγησε την αντιοξειδωτική ικανότητα του συγκεκριμένου βοτάνου με τη μέθοδο DPPH για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών και τόνισε τη συμβολή του καρνοσικού οξέος στη δράση αυτή (Erkan *et al.*, 2008). Ακόμη, πρόσφατη έρευνα σε επίμυες απέδειξε την αντιοξειδωτική δράση της κερκετίνης, που αποτελεί ένα από τα συστατικά στο Δίκταμο, το Σπαθόχορτο, το Φασκόμηλο και το Χαμομήλι, η οποία έχει την ικανότητα να επιδρά στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και της ομοκυστεΐνης (Zhao *et al.*, 2011). Τέλος, οι Soobrattee *et al* (2005) σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολικών συστατικών έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολικών συστατικών μειώνεται σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά:

Προκυανιδίνες > φλαβανόλες > φλαβονόλες > υδροξυ-κινναμωμικά οξέα > απλά φαινολικά οξέα

3.3 Μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα της Γαλακτικής Αφυδρογονάσης (LDH)

Η γαλακτική αφυδρογονάση είναι ένα ένζυμο που εκκρίνεται φυσιολογικά από όλα τα κύτταρα είτε κατά το φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο είτε κατά το θάνατο που επέρχεται στα κύτταρα κάποιου ιστού όταν αυτά υφίστανται βλάβη από κάποιον ενδογενή ή εξωγενή παράγοντα (Danpure, 2004). Πριν γίνει η μελέτη της επίδρασης των αφεψημάτων στην έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων από διεγερμένα PBMCs, τα αφεψήματα ελέγχθηκαν για την πιθανότητα να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Ο έλεγχος έγινε με τη μέτρηση της συγκέντρωσης της *LDH* σε υπερκείμενα καλλιεργειών στις οποίες επέδρασαν μεμονωμένα αφεψήματα σε διάφορες δόσεις.

Στον πίνακα 3.2 απεικονίζεται η % θανάτωση των κυττάρων μετά από την επίδραση διαφορετικών δόσεων από τα εκχυλίσματα των βοτάνων.

<i>Βότανο</i>	Κυτταροτοξικότητα (%)			
	Δόση (μg)	<5 (%)	<10 (%)	≥10 (%)
Αντωνάϊδα	200	✓		
	500	✓		
	1000			✓
	2000			✓
Δενδρολίβανο	200	✓		
	500	✓		
	1000		✓	
	2000		✓	
Δίκταμο	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000		✓	
Θρύμπα	200	✓		
	500	✓		
	1000		✓	
	2000		✓	
Θυμάρι	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000		✓	
Μαντζουράνα	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000	✓		
Ρίγανη	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000	✓		
Σπαθόχορτο	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000	✓		
Τσάι βουνού	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000		✓	
Φασκόμηλο	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000		✓	
Φλισκούνι	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		
	2000	✓		
Χαμομήλι	200	✓		
	500	✓		
	1000	✓		

	2000	✓
Μελισσόχορτο	200	✓
	500	✓
	1000	✓
	2000	✓

Πίνακας 3.2: Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα βιωσιμότητας των PBMCs.

Το βότανο που δεν φαίνεται να επιδρά στον κυτταρικό πληθυσμό είναι το Χαμομήλι, για το οποίο ακόμα και στη δόση των 2000μg δεν παρατηρείται καθόλου μείωση της βιωσιμότητας. Η βιωσιμότητα ελάχιστα επηρεάζεται από τη δόση των 500μg της Αντωναΐδας, αυξάνεται όμως καθώς αυξάνεται η δόση του βοτάνου στα 1000μg και 2000μg. Για το αφέψημα του Φασκόμηλου, παρατηρείται ότι δόσεις μεγαλύτερες από τα 500μg προκαλούν κυτταροτοξικότητα στα PBMCs. Όσον αφορά στο αφέψημα από το Τσάι του Βουνού, μόνο η δόση των 2000μg φαίνεται να προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα. Για τα αφεψήματα από το Φλισκούνη, Μελισσόχορτο, Ρίγανη, Μαντζουράνα και Σπαθόχορτο η επίδραση στα κύτταρα σε όλες τις δόσεις φαίνεται να μην προκαλεί τοξικότητα μεγαλύτερη του 5%. Το αφέψημα του Θυμαριού προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας περίπου 10% στη δόση των 2000μg. Τέλος, τα αφεψήματα από Δενδρολίβανο, Δίκταμο και Θρύμπα εμφανίζουν τον ίδιο τρόπο δράσης όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα, καθώς μέχρι και τη δόση των 500μg το ποσοστό κυτταροτοξικότητας φαίνεται να είναι έως 5%.

Βιβλιογραφικά, έχει αναφερθεί τοξικότητα από ουσίες που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Η τοξικότητα αυτή προκαλείται ιδιαίτερα όταν οι συγκεκριμένες ουσίες χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις οπότε και η δράση τους αυτή υπερτερεί έναντι της ευεργετικής δράσης που έχουν στην υγεία του ανθρώπου (Skibola & Smith, 2000 & Chen & Kong, 2005). Ειδικότερα για τα φλαβονοειδή, έχει αναφερθεί ότι όταν χορηγούνται σε υψηλότερες δόσεις από αυτές που συστήνονται και θεωρούνται ασφαλείς, ενδέχεται να δράσουν ως μεταλλαξιογόνοι παράγοντες, ως προ-οξειδωτικά που απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες και προκαλούν βλάβη στα κύτταρα ή ως αναστολείς σημαντικών ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των ορμονών (Skibola & Smith, 2000). Επιπλέον, από μια έρευνα σχετικά με τη δράση των φλαβονοειδών απιγενίνη, χρυσίνη και λουτεολίνη, αποδείχθηκε ότι όταν αυτά χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις σε PBMCs που είτε έχουν είτε δεν έχουν διεγερθεί από LPS, προκαλούν αύξηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων, συνεπώς

και αύξηση της έκκρισης της LDH, και ενδέχεται ακόμη και να εξαφανίζονται τα συγκεκριμένα κύτταρα, όπως προέκυψε έπειτα από μέτρηση του αριθμού τους με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Houggue *et al.*, 2005). Σε μια έρευνα υποστηρίχθηκε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα διάφορα εκχυλίσματα ως προς την κυτταροτοξικότητα μπορεί να οφείλονται στη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στη χημική δομή και την ακόλουθη δραστηριότητα τους, ωστόσο αυτή η παρατήρηση είναι αμφιλεγόμενη (Lyu & Park, 2005 & Argyropoulou, *et al.*, 2012). Τέλος, αναφορικά με τις ταννίνες που περιέχονται σε ορισμένα από τα βότανα παρατηρήθηκε ότι η κυτταροτοξικότητα που μπορεί να προκαλούν στα PBMCs είναι πιθανό να οφείλεται σε μια ενδεχόμενη αυθόρμητη οξείδωση αυτών (Wisman *et al.*, 2008).

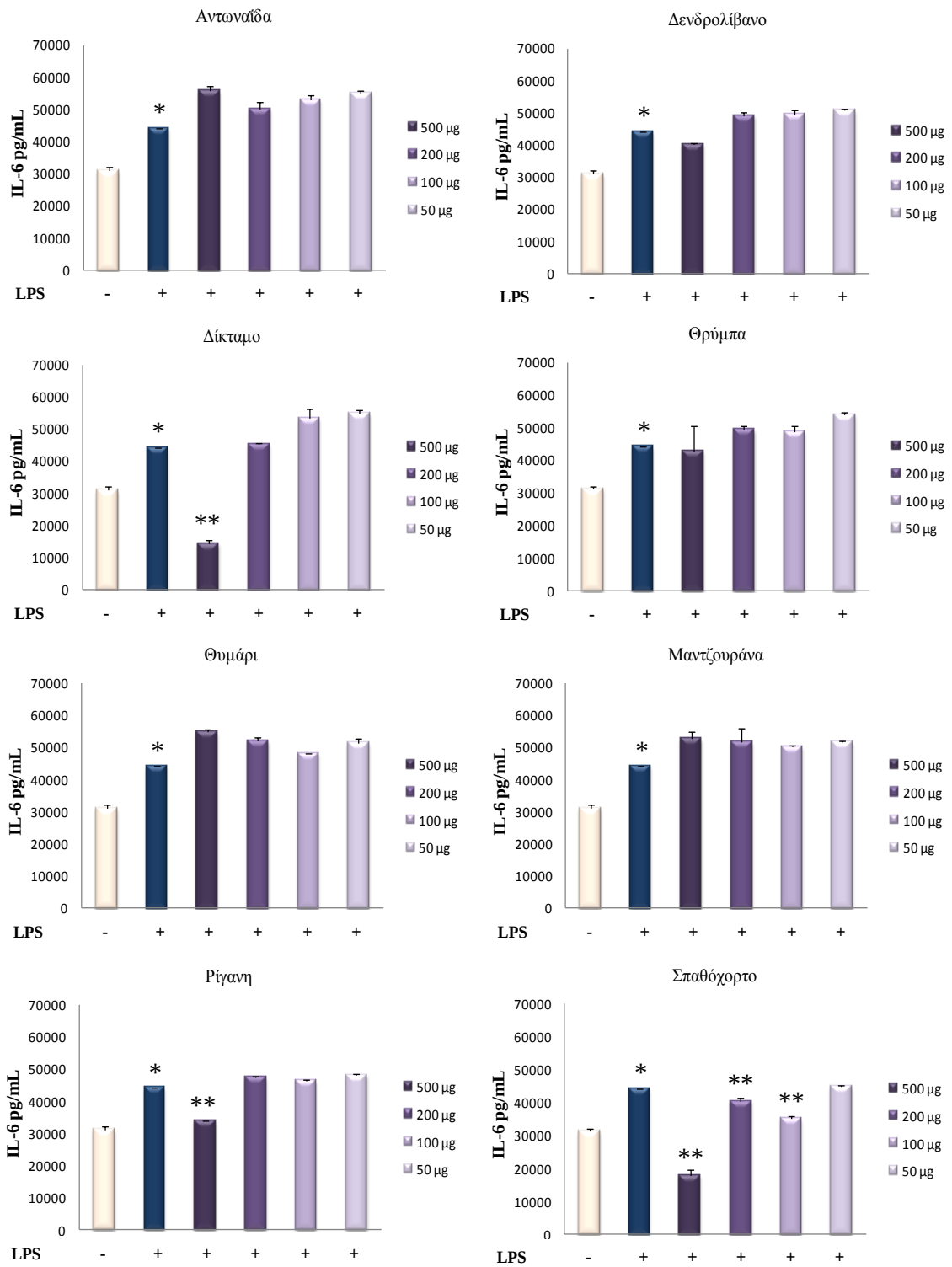
Από το σύνολο των αποτελεσμάτων στον έλεγχο κυτταρικού θανάτου, αποφασίσθηκε στη συνέχεια επίδραση σε διεγερμένα κύτταρα PBMCs να γίνει με δόσεις των 50, 100, 200 και 500μg.

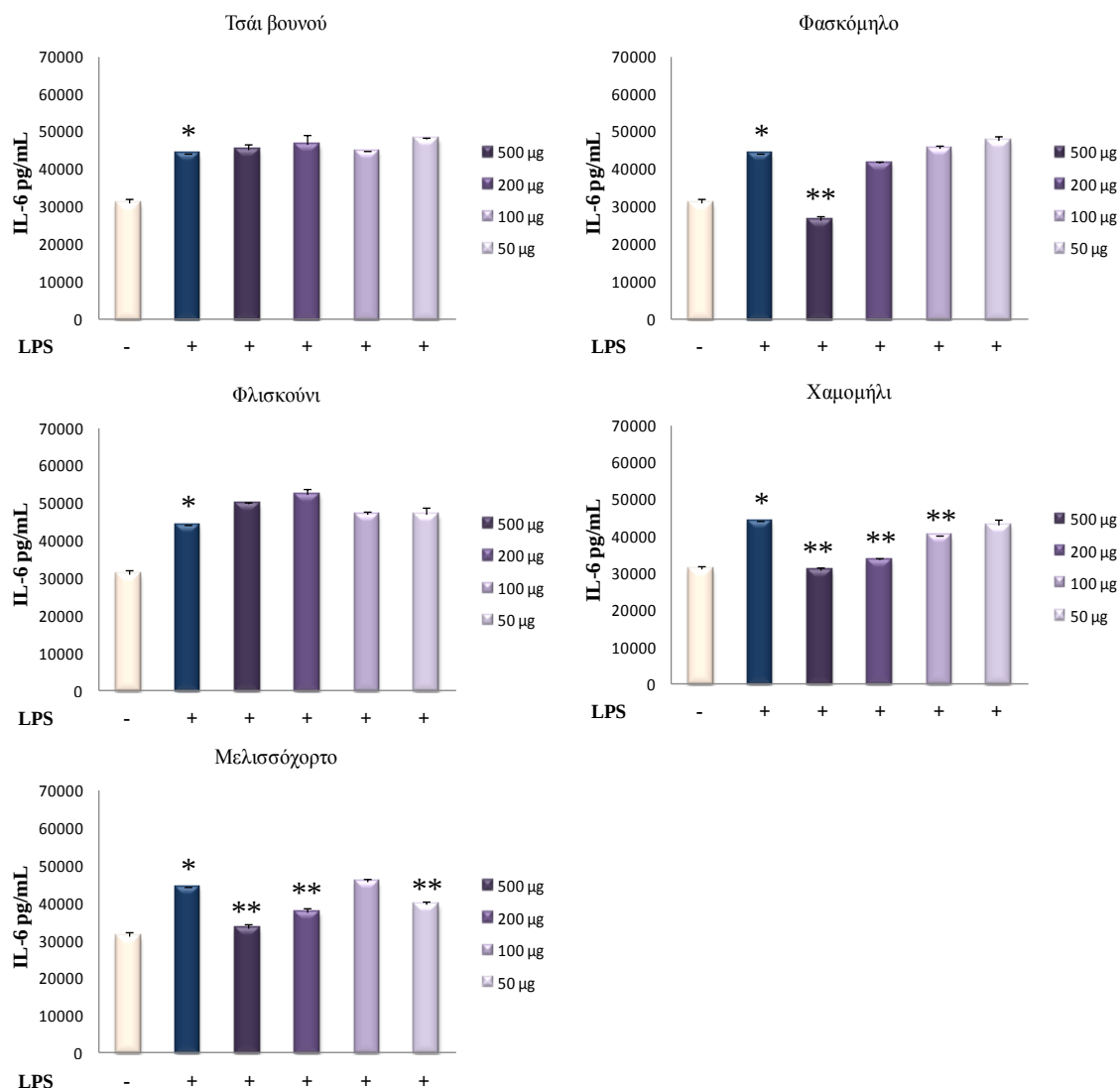
3.4 Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα έκκρισης της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) από τα PBMCs

Η ιντερλευκίνη-6 είναι μια ομοδιμερής κυτταροκίνη μοριακού βάρους 21-28kD που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσική όσο και στην ειδική ανοσία (Damjanov, 2009). Σχετικά με την τριτοταγή της δομή, αποτελείται από μια δέσμη τεσσάρων α-ελίκων οι οποίες σχηματίζουν δύο ζεύγη αντιπαράλληλων α-ελίκων (Τουμπανάκης & Βασιλακόπουλος, 2007). Ο Ferguson-Smith (1988) και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι πρόκειται για μια πλειοτροπική κυτταροκίνη. Συντίθεται και εκκρίνεται από διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, τα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, οι ινοβλάστες και τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα προκειμένου να ενεργοποιήσει την ανοσοαπόκριση (Van der Poll *et al.*, 1997 & Damjanov, 2009). Επιπλέον, η IL-6 θεωρείται μυοκίνη, δηλαδή κυτταροκίνη που παράγεται από τους μύες και αυξάνεται σε απάντηση μυϊκής σύσπασης (Febbraio, 2005).

Σχετικά με τις βιολογικές της δράσεις στη φυσική ανοσία, η συγκεκριμένη ιντερλευκίνη επάγει τη σύνθεση των πρωτεϊνών οξείας φάσης από τα κύτταρα του ήπατος καθώς και την παραγωγή ουδετερόφιλων από πρόδρομες σειρές του μυελού των οστών. Στην ειδική ανοσία, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων για την παραγωγή αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, δρα ως αυτοκρινής παράγοντας σε νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα. Τέλος, έχουν αναφερθεί και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της IL-6, οι οποίες αποδίδονται στην ικανότητά της να ρυθμίζει και να καταστέλλει τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως του TNF-α χωρίς όμως να επηρεάζει τα επίπεδα αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-10 (Damjanov, 2009).

Η IL-6 έχει συσχετισθεί με διάφορες εκφυλιστικές ασθένειες όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης (Kristiansen, 2005), η αθηροσκλήρωση (Dubinski, 2007), η νόσος Alzheimer (Swardfager, 2010), διάφορους τύπους καρκίνου (Smith, 2001) καθώς και αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Nishimoto, 2006). Κατ' επέκταση, ουσίες που μπορούν να αναστείλουν την έκκριση της, έχουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά για τα προαναφερθέντα νοσήματα. Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 3.3), παρουσιάζονται τα επίπεδα της ιντερλευκίνης μετά από επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων έπειτα από 24h επώαση στα PBMCs.





Διάγραμμα 3.3: Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 στα PBMCs έπειτα από 24h επώασης. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει η LPS (control) και εκείνων του blank ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει η LPS και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο $\mu\text{o} \pm \text{S.D}$ δύο πειραμάτων.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, τα PBMCs εκκρίνουν την ιντερλευκίνη-6. Η λιποπολυσακχαρίδη (LPS) προστέθηκε προκειμένου να διεγερθούν τα κύτταρα και να αυξηθούν τα επίπεδα έκκρισής της. Η διέγερση των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της κυτταροκίνης (De Groote et al., 1992 & Philip et al., 2002). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι κάποια από τα αφεψήματα των βοτάνων μειώνουν τα επίπεδα της IL-6.

Εξετάζοντας την επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα της IL-6 που εκκρίνεται από τα PBMCs, φάνηκε ότι το πιο δραστικό από αυτά ήταν το Δίκταμο. Συγκεκριμένα, μετά από επίδραση με 500μg στερεού υπολείμματος από το αφέψημα για 24h, τα επίπεδα IL-6 μειώθηκαν σε επίπεδα κάτω του 50% των αντίστοιχων επιπέδων των κυττάρων που δεν είχαν υποστεί καμία επίδραση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή για τις υπόλοιπες δόσεις που μελετήθηκαν. Αντίθετα, η επίδραση με αφέψημα Σπαθόχορτου, προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκκρισης της κυτταροκίνης. Η μείωση αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική με εξαίρεση τη δόση των 50μg για την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκκρινόμενη ποσότητα IL-6 που μετρήθηκε για τη δόση των 500μg ήταν περίπου 50% χαμηλότερη από την αντίστοιχη του blank. Η ίδια σχέση δόσοεξάρτησης παρατηρήθηκε και μετά από την επίδραση με το αφέψημα Χαμομηλιού με τη δόση των 50μg να μην προκαλεί, ομοίως, κάποια επίδραση στα επίπεδα της IL-6. Πιο αναλυτικά, η μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της κυτταροκίνης παρατηρήθηκε μετά από επίδραση με 500μg αφεψήματος, η οποία υπολογίστηκε στα επίπεδα των κυττάρων που δεν είχαν υποστεί επίδραση. Στατιστικά σημαντική μείωση βρέθηκε και έπειτα από επίδραση 500μg από τα αφεψήματα Ρίγανης και Φασκόμηλου, η οποία ήταν της τάξης του 33,9 και 40% αντίστοιχα συγκριτικά με το control. Τέλος, έπειτα από την επίδραση με το αφέψημα από το Μελισσόχορτο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκκρισης σε όλες τις δόσεις με εξαίρεση τη δόση των 100μg. Μάλιστα, όσο μειωνόταν η δόση τόσο μικρότερη ήταν και η μείωση που προκαλούνταν στα επίπεδα της IL-6, οι οποίες ήταν 24,5%, 15% και 10,4% για τις δόσεις των 500μg, των 200μg και των 50μg αντίστοιχα σε σύγκριση με το blank. Στη μεγαλύτερη δόση η παρατηρούμενη έκκριση της IL-6 ήταν κοντά στα επίπεδα των κυττάρων που δεν είχαν διεγερθεί με LPS.

Η επίδραση των αφεψημάτων των υπό μελέτη βοτάνων στα επίπεδα της IL-6 από τα υπο μελέτη βότανα είναι στενά συνδεδεμένη με το φαινολικό τους περιεχόμενο. Πιο συγκεκριμένα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε αποδεικνύει την ευεργετική δράση που ασκούν φλαβονοειδή όπως η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η χρυσίνη στα επίπεδα της IL-6 αναστέλλοντας την παραγωγή της συγκεκριμένης κυτταροκίνης καθώς και άλλων προφλεγμονωδών παραγόντων και περιορίζοντας τη

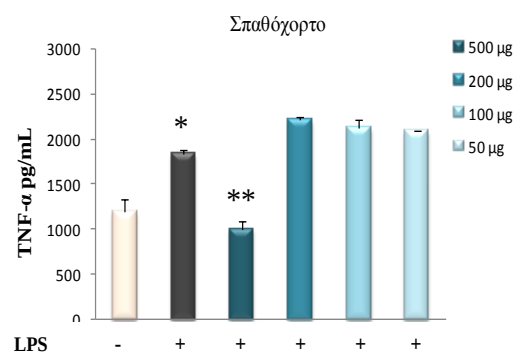
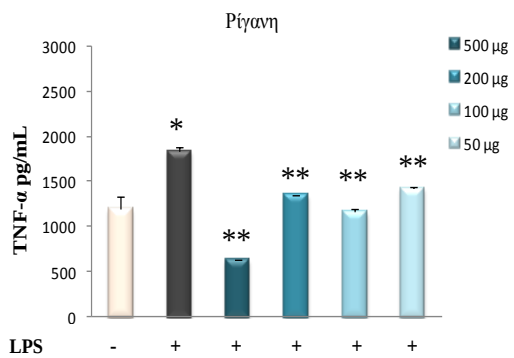
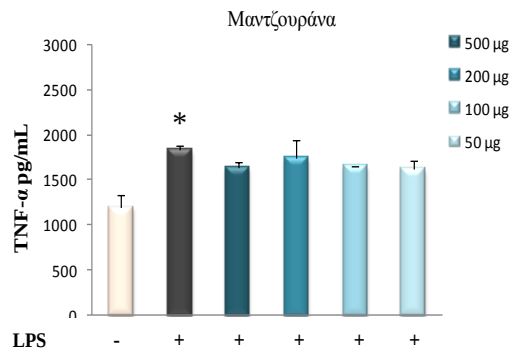
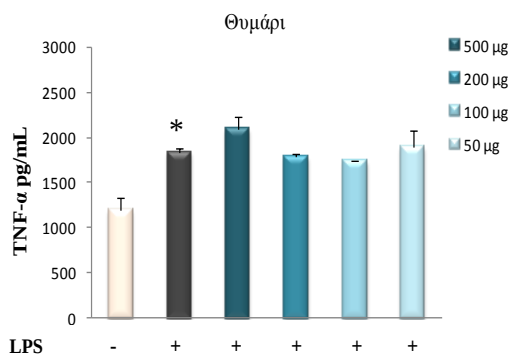
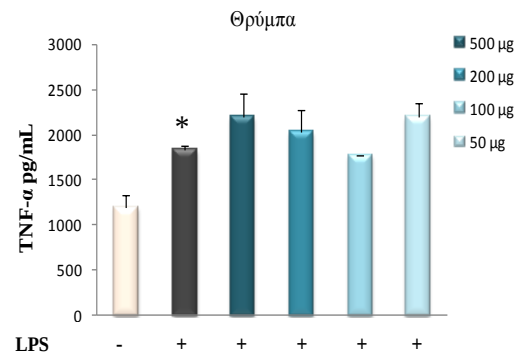
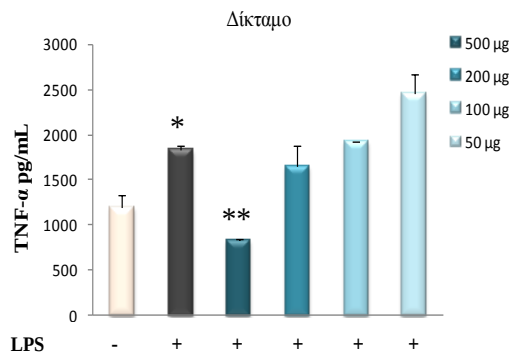
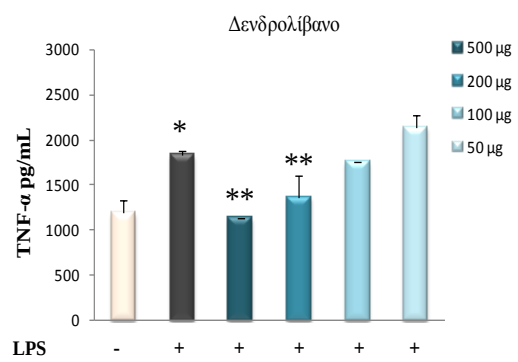
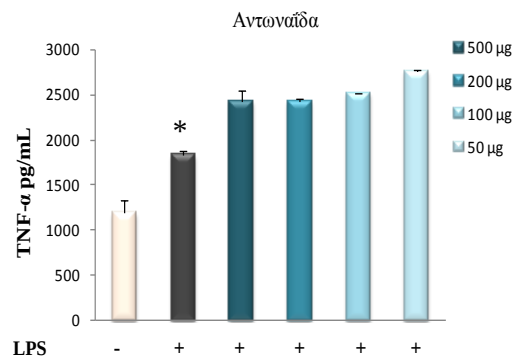
βλάβη που προκαλεί η LPS στα PBMCs (Hougee *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι και οι φλαβονόλες κερκετίνη και καμπφερόλη, προκαλούν μείωση των επιπέδων της IL-6 από τα PBMCs και τα σιτευτικά κύτταρα καθώς και η μυρισετίνη (Kempuraj *et al.*, 2009 & Yeh *et al.*, 2009). Όσον αφορά στο καφεϊκό οξύ τα αποτελέσματα από έρευνες είναι αμφιλεγόμενα: κάποιες υποστηρίζουν ότι η παρουσία του συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων της IL-6 ενώ κάποιες άλλες αναφέρουν ότι δεν ασκεί κάποια επίδραση στην έκκριση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης (Miles *et al.*, 2005 & Bertelli *et al.*, 2006 & Santangelo *et al.*, 2009). Ευεργετική φάνηκε να είναι, επίσης, η δράση της 1,8-κινεόλης από το Θυμάρι και το Δενδρολίβανο, στη μείωση των επιπέδων της IL-6 που εκκρίνουν τα μονοκύτταρα έπειτα από τη διέγερση με LPS, όχι όμως στον ίδιο βαθμό που επηρεάζουν την έκκριση του TNF- α (Juergens *et al.*, 2004). Τέλος, έρευνες αποδίδουν τα μειωμένα επίπεδα της κυτταροκίνης IL-6 στο μονοτερπένιο λιμονένιο που υπάρχει στο Χαμομήλι, και ειδικότερα στο D-λιμονένιο, το οποίο έχει την ικανότητα να αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου της IL-6 αλλά και την έκκρισή της από τα μακροφάγα (Yoon *et al.*, 2010).

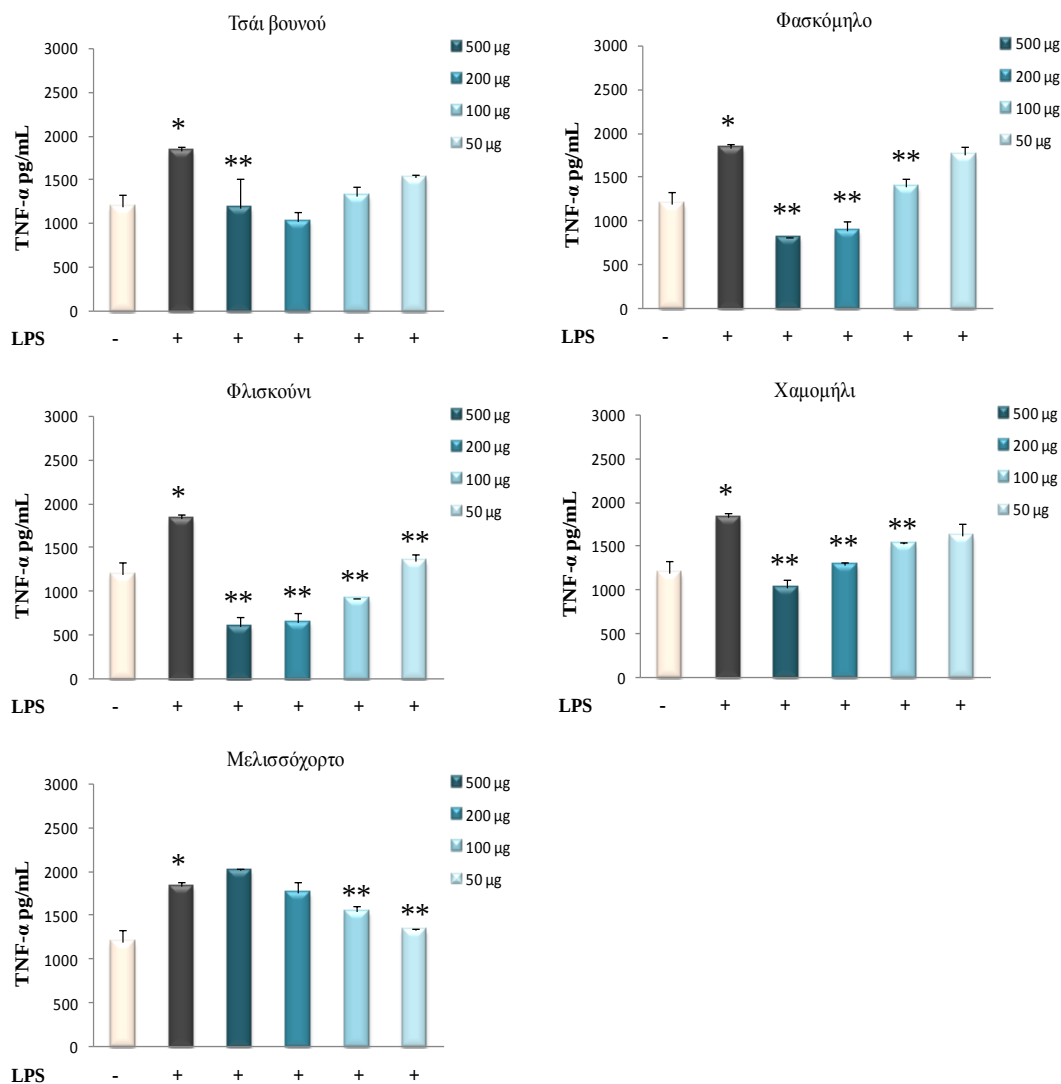
3.5 Επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα έκκρισης του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF- α) από τα PBMCs

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor α , TNF- α), είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος MB=26kD της οποίας το αμινοτελικό τελικό άκρο είναι ενδοκυττάριο και το καρβοξυτελικό άκρο είναι εξωκυττάριο. Ο μεμβρανικός TNF- α είναι ένα ομοτριμερές. Άλλη ονομασία του είναι καχεξίνη. Κύρια πηγή παραγωγής του είναι τα ενεργοποιημένα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αν και μικρότερες ποσότητες του μπορούν να παραχθούν και από διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα (Turner *et al.*, 2005), σιτευτικά κύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς. Το κυριότερο ερέθισμα για την παραγωγή του είναι η λιποπολυσακχαρίδη LPS, μια ενδογενής τοξίνη που παράγεται από το Gram (-) βακτήριο *Escherichia coli*. Η ιντερφερόνη- γ , που παράγεται από τα T-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς, ενισχύει την παραγωγή του TNF- α από τα διεγερμένα με LPS μακροφάγα (Damjanov, 2009).

Ο TNF-α αρχικά προσδιορίστηκε το 1975 από τον Old, ενώ το 1991, χαρακτηρίστηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας και ως παράγοντας τοξικός για πολλά κακοήθη κύτταρα. Πλέον, είναι σαφές ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού εναντίον ιών, βακτηρίων και παρασίτων που ευθύνονται για λοιμώξεις που προσβάλλουν τον οργανισμό αλλά και στην ανοσοαπόκριση. Η έκκρισή του σε φυσιολογικές ποσότητες ασκεί προστατευτική δράση στον οργανισμό όμως η υπερβολική του παραγωγή μπορεί να είναι επιβλαβής ακόμη και θανατηφόρα για τον ξενιστή ενώ έκθεση του οργανισμού για παρατεταμένο χρονικό διάστημα σε χαμηλές συγκεντρώσεις TNF-α μπορεί να οδηγήσει σε καχεξία (*Said et al.,2010*).

Πρόκειται για μια κυτταροκίνη η οποία συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονής και ενεργοποιεί την αντίδραση οξείας φάσης. Ο πρωταρχικός ρόλος του TNF-α είναι η ρύθμιση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή η ενίσχυση της επιστράτευσης ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στις περιοχές που εντοπίζεται η λοίμωξη (*Damjanov, 2009*). Ο TNF-α είναι ένα ενδογενές πυρετογόνο που δύναται να προκαλέσει πυρετό προκειμένου να αντιμετωπιστεί κάποια λοίμωξη επάγοντας την παραγωγή προσταγλανδινών (κάτι που έγινε γνωστό ήδη από το 1986 από τους *Dinarello* και τους συνεργάτες του) να επάγει τον κυτταρικό θάνατο, να προκαλέσει σήψη μέσω της δράσης των ιντερλευκινών 1 και 6, να οδηγήσει σε καχεξία και φλεγμονή και να αποτρέψει την καρκινογένεση και τον ιικό πολλαπλασιασμό. Δρα με μηχανισμό αυτοκρινή πάνω στα φαγοκύτταρα προκαλώντας αλλαγή στον κυτταροσκελετό τους με τέτοιο τρόπο ώστε αυτά να μπορέσουν να ενθυλακώσουν τα βακτήρια και να τα κλείσουν σε μικρά κυστίδια, τα λεγόμενα *φαγοσώματα*. Δυσλειτουργία (ανεπάρκεια ή αδρανοποίηση) στην παραγωγή του TNF-α έχει συσχετισθεί με αδυναμία ελέγχου των λοιμώξεων και διάφορες νόσους συμπεριλαμβανομένων της νόσου Alzheimer (*Swardfager et al.,2010*), του καρκίνου (*Locksley et al.,2001*), της κατάθλιψης (*Dowlati et al.,2010*) και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (*Brynskov et al., 2002*). Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 3.4), παρουσιάζονται τα επίπεδα του TNF-α μετά από επίδραση με τα αφεψήματα των βοτάνων της παρούσας μελέτης έπειτα από επώαση 24h στα PBMCs.





Διάγραμμα 3.4: Επίδραση των αφεψημάτων στα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF-α) στα PBMCs έπειτα από επώαση 24h. Ο (*) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει η LPS (control) και εκείνων του blank ενώ ο (**) δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των κυττάρων στα οποία έχει επιδράσει η LPS και εκείνων στα οποία είχαν επιδράσει και τα αφεψήματα των βοτάνων. Οι τιμές είναι ο $\mu.ο \pm S.D$ δύο πειραμάτων.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω διαγράμματα, τα PBMCs εκκρίνουν και τον TNF-α καθώς παρατηρείται έκκριση του και από τα μη διεγερμένα κύτταρα. Έπειτα από διέγερση αυτών με την τοξίνη LPS, τα επίπεδα έκκρισής του αυξήθηκαν, αποτέλεσμα που ήταν αναμενόμενο καθώς είναι γνωστό ότι ο κύριος παράγοντας διέγερσης για την παραγωγή/έκκριση του TNF-α είναι η συγκεκριμένη λιποπολυσακχαρίδη (Baily et al., 1990 & De Groote et al., 1992 & Damjanov, 2009).

Η ακόλουθη επίδραση με κάποια από τα βότανα που μελετήθηκαν είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του TNF-α.

Εξετάζοντας την επίδραση των αφεψημάτων των βοτάνων στα επίπεδα έκκρισης του TNF-α, προκύπτει ότι η μεγαλύτερη επίδραση ασκείται από τη Ρίγανη και το Φλισκούνι. Ειδικότερα, η μείωση που προκαλεί η δόση των 500μg από το στερεό υπόλειμμα και των δύο εκχυλισμάτων είναι της τάξης του 65,7% και 66,7% αντίστοιχα σε σύγκριση με το control ενώ συγκριτικά με το blank τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 49% για τη Ρίγανη και 47,5% για το Φλισκούνι, δηλαδή προκαλούν μείωση περίπου 50% ως προς την έκκριση από τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί διέγερση. Επιπλέον, η παρατηρούμενη μείωση της έκκρισης από όλες τις δόσεις των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική ενώ στο Φλισκούνι η μείωση ήταν και δόσοεξαρτώμενη. Δόσοεξάρτηση στη μείωση παρατηρήθηκε και έπειτα από την επίδραση με τα αφεψήματα από Φασκόμηλο και Χαμομήλι για τις δόσεις των 500μg, 200μg και 100μg ενώ η δόση των 50μg δε φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στα επίπεδα του TNF-α. Ακόμη, το αφέψημα από το Δενδρολίβανο στη δόση των 500μg προκάλεσε μείωση της έκκρισης του TNF-α σε επίπεδα χαμηλότερα από το blank ενώ η δόση των 200μg μείωσε την έκκριση της κυτταροκίνης σε επίπεδα περίπου ίσα με εκείνα που εκκρίνονται από τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν διεγερθεί. Σχετικά με την επίδραση του αφεψήματος από Δίκταμο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση μόνο από τη δόση των 500μg σε επίπεδα περίπου ίσα με το blank ενώ οι υπόλοιπες δόσεις δε φάνηκαν να έχουν κάποια επίδραση. Το στερεό υπόλειμμα από το αφέψημα από το Σπαθόχορτο και το Τσάι του βουνού προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση μόνο στη δόση των 500μg. Τέλος, το εκχύλισμα του Μελισσόχορτου προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση μόνο στις δύο μικρότερες δόσεις, των 100μg και 50μg, σε σχέση με το control ενώ η μεγαλύτερη δόση των 500μg προκάλεσε αύξηση της έκκρισης, κάτι που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο βότανο σε μεγάλες δόσεις εμφανίζει προοξειδωτική δράση.

Βιβλιογραφικά, τα συστατικά των βοτάνων που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι οι πολυφαινόλες όσον αφορά την επίδρασή τους στην έκκριση των προφλεγμονωδών παραγόντων. Ειδικές αναφορές έχουν γίνει για την ευεργετική επίδραση των φλαβονοειδών σχετικά με την αναστολή της παραγωγής του TNF-α

(Comalada *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η κερκετίνη, που ανήκει στις φλαβονόλες, έχει την ικανότητα να καταστέλλει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από διεγερμένα με LPS PBMCs (Yeh *et al.*, 2009). Η επίδραση της στα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF- α), ειδικότερα, σχετίζεται με το γεγονός ότι η κερκετίνη μπορεί να ρυθμίζει τόσο την παραγωγή του όσο και την έκφραση του γονιδίου του TNF- α στα PBMCs (Nair *et al.*, 2005). Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν ότι οι φλαβόνες απιγενίνη, λουτεολίνη και χρυσίνη ασκούν ανασταλτική δράση στην παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων συμπεριλαμβανομένου του TNF- α , από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος τα οποία έχουν διεγερθεί με LPS. Μάλιστα, επηρεάζουν και τη μεταβολική δράση που ασκεί η συγκεκριμένη τοξίνη στα PBMCs ενώ ενδέχεται να επηρεάσουν και τον αριθμό των κυττάρων στον οποίο αρχικά επιδρούν όταν χορηγούνται σε μεγάλες δόσεις, όπως φάνηκε έπειτα από μέτρηση με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Από τις τρεις αυτές φλαβόνες η πιο ισχυρή φαίνεται να είναι η απιγενίνη (Hougee *et al.*, 2005). Τα στοιχεία από τις παραπάνω έρευνες μπορούν να αιτιολογήσουν τη μείωση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα του TNF- α από το Φασκόμηλο, το Δίκταμο, το Χαμομήλι, το Τσάι του Βουνού και το Σπαθόχορτο καθώς περιέχουν όλα ή κάποια από τα πολυφαινολικά συστατικά που προαναφέρθηκαν. Όσον αφορά στην επίδραση του αφεψήματος από τη Ρίγανη, μια πρόσφατη μελέτη που υποστηρίζει την αντιφλεγμονώδη δράση του συγκεκριμένου βοτάνου, αποδεικνύει, επίσης τη μείωση των επιπέδων του TNF- α καθώς και άλλων κυτταροκινών, δράση που αποδίδεται στα βασικά συστατικά που αυτό περιέχει, δηλαδή στη θυμόλη και την καρβακρόλη (Ocana- Fuentes *et al.*, 2010). Ακόμη, μια μελέτη απέδειξε τη συμβολή της 1,8-κινεόλης, η οποία περιέχεται στο Θυμάρι και το Δενδρολίβανο, στη μείωση των επιπέδων του TNF- α (Juergens *et al.*, 1998 & Juergens *et al.*, 2004) ενώ μια άλλη μελέτη υποστηρίζει και τη δράση του φερουλικού οξέος ως συστατικό που συμβάλλει στη μείωση της έκκρισης του (Gohil *et al.*, 2012). Τέλος, η μείωση των επιπέδων του TNF- α από τα PBMCs που διεγέρθηκαν με τη συγκεκριμένη τοξίνη μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία του καφεϊκού οξέος, το οποίο υπάρχει σε αρκετά από τα υπό μελέτη βότανα και το οποίο είναι σε θέση να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου για την παραγωγή του TNF- α (Bertelli *et al.*, 2006) αλλά και στο μονοτερπένιο λιμονένιο που μπορεί, επίσης, να αναστείλει την έκφραση του γονιδίου του (Yoon *et al.*, 2010).

Επίλογος- Συμπεράσματα

Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί σημαντικές αλλαγές και πρόοδος ως προς την αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, οι παθήσεις αυτές εξακολουθούν να αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου στις Δυτικές κοινωνίες. Αν και τα νοσήματα αυτά σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το γονιδιακό υπόστρωμα, εντούτοις σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες, στους οποίους ανήκει και η διατροφή. Υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι μια ισορροπημένη διατροφή χαμηλή σε λιπαρά που είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά ολικής άλεσης αλλά και αφεψήματα από βότανα που, παραδοσιακά, καταναλώνονται για τις ευεργετικές τους δράσεις, μπορεί να συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η προστατευτική δράση των παραπάνω τροφών αποδίδεται τόσο στα συστατικά που έχουν θρεπτική αξία, όπως είναι οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία αλλά και σε συστατικά που δεν έχουν θρεπτική αξία και δεν είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ζωής, ωστόσο, ενισχύουν τον οργανισμό, όπως οι πολυφαινόλες και άλλα φυτοχημικά.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήθηκαν τα αφεψήματα από βότανα της Ελληνικής μικροχλωρίδας που ήταν γνωστό ήδη από προηγούμενη μελέτη ότι περιέχουν πλήθος πολυφαινολικών συστατικών. Το βότανο που βρέθηκε να είναι δραστικό σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ήταν η Ρίγανη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ήδη από την αρχαιότητα τόσο στις μαγειρικές παρασκευές όσο και ως αφέψημα για διάφορες παθήσεις. Ωστόσο, με βάση τη μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε το βότανο που φάνηκε να έχει τη μεγαλύτερη απόδοση ήταν το Μελισσόχορτο παρουσιάζοντας σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη βότανα.

Μελετήθηκαν, επίσης, διάφορες δόσεις από τα αφεψήματα προκειμένου να προσδιοριστεί εκείνη η δόση μετά την οποία αυτά ενδέχεται να προκαλέσουν τοξικότητα στα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία της παρούσας πτυχιακής. Αυτό έγινε εφικτό μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων της γαλακτικής αφυδρογονάσης που εκκρίνεται από τα κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση. Τα περισσότερα βότανα φάνηκαν να παρουσιάζουν σχετικά μικρή τοξικότητα έπειτα από την επίδραση με

500μg αφεψημάτος. Το βότανο που εμφάνισε τα μεγαλύτερα ποσοστά κυτταροτοξικότητας ήταν η Αντωναΐδα ενώ το Χαμομήλι δεν προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ακόμα και μετά από την επίδραση με 2000μg. Για το λόγο αυτό, στα υπόλοιπα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η μέγιστη δόση που χρησιμοποιήθηκε από τα εκχυλίσματα ήταν τα 500μg.

Συνεχίζοντας, εξετάστηκε η ικανότητα των αφεψημάτων να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στον ορό ή να αυξάνουν το χρόνο οξείδωσης αυτών, αφού είχε προηγηθεί επίδραση στον ορό με ιόντα χαλκού (Cu^{2+}). Τα βότανα των οποίων τα εκχυλίσματα αποδείχθηκαν να είναι πιο ισχυρά ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ήταν η Ρίγανη, το Μελισσόχορτο, η Θρύμπα και το Δίκταμο, τα οποία σημείωσαν τη μεγαλύτερη αύξηση του χρόνου οξείδωσης της LDL. Ωστόσο, όλα τα βότανα παρουσίασαν καθυστέρηση στο χρόνο οξείδωσης κάτι που ενισχύει τις υποθέσεις για τη χρήση τους ως αντιοξειδωτικών.

Ακολούθως, μελετήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση των συγκεκριμένων βοτάνων. Η μελέτη αυτής της δράσης έγινε με ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων δύο κυτταροκινών που εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες έπειτα από διέγερση των PBMCs με την τοξίνη LPS, του παράγοντα νέκρωσης των όγκων ($\text{TNF-}\alpha$) και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6). Τα βότανα που προκάλεσαν μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων του $\text{TNF-}\alpha$ ήταν η Ρίγανη, το Φλισκούνι, το Φασκόμηλο και το Χαμομήλι ενώ στα επίπεδα της IL-6 μεγαλύτερη επίδραση αποδείχθηκαν να έχουν το Δίκταμο, το Σπαθόχορτο, το Χαμομήλι και η Ρίγανη.

Εν κατακλείδι, περαιτέρω έρευνα πρέπει να γίνει προκειμένου να ελεγχθεί ο τρόπος δράσης των αφεψημάτων από τα συγκεκριμένα βότανα και σε άλλα μονοπάτια στο μηχανισμό φλεγμονής του ανοσοποιητικού συστήματος, για παράδειγμα, η επίδρασή τους σε άλλες κυτταροκίνες ή ακόμη και συνδυαστικά με τη δράση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος της γλουταθειόνης αλλά και να γίνει μελέτη σε επίπεδο γονιδίου όσον αφορά στον ειδικό υποδοχέα για την oxLDL που εκφράζεται στα μονοκύτταρα/μακροφάγα. Επιπλέον, απαραίτητος είναι και ο προσδιορισμός των ακριβών σημείων δράσης των διαφόρων πολυφαινολικών συστατικών που αυτά περιέχουν αλλά και του ποσοστού στο οποίο αυτά είναι βιοδιαθέσιμα μετά την πρόσληψή τους. Ακόμη, καθώς τα βότανα αυτά φαίνεται να

επιδρούν στην εξέλιξη της αρτηριοσκλήρυνσης μέσω της δράσης τους στο χρόνο οξείδωσης της LDL, που αποτελεί σημείο-κλειδί για τη συγκεκριμένη πάθηση, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μελέτες σε ζωικά πρότυπα και συγκεκριμένα κουνέλια, τα οποία είναι και τα μόνα που αναπτύσσουν αθηρωματικές πλάκες, προκειμένου να ελεγχθεί και εκεί η δράση τους. Θα μπορούσαν, επίσης, να συμπεριληφθούν σε έρευνες *in vivo* κυρίως για άτομα που ακολουθούν πρότυπα διατροφής δυτικού τύπου και να μελετηθούν για τη συμμετοχή τους στη βελτίωση της υγείας. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνέβαλαν στον εμπλουτισμό της γνώσης μας για την αντιοξειδωτική και γενικά την ευεργετική δράση των συγκεκριμένων βοτάνων της Ελληνικής μικροχλωρίδας.

Βιβλιογραφία

- Abdullaev F. I., Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (Crocus sativus L.). *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227(1): 20–25.
- Abebe W., Herbal Medication: Potential for Adverse Interactions with Analgesic Drugs, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2002; 27: 391–401.
- Achi A. Al-. Herbs That Affect Blood Glucose Levels. *Women's Health in Primary Care* 2005; 8(7): 325–330
- Aggarwal B. B., Vijayalekshmi R. V. and Suug B., Targeting Inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe, *Clinical cancer Res*, 2009; 15(2): 425-430
- Ahmad A., Sakr W.A, Rahman K.M., Anticancer Properties of indole compounds: mechanism of apoptosis induction and role in chemotherapy, *Europe Pubmed Central.*, 2010; 11(6): 652-666
- Akhondzadeh S. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2003; 74:863-866
- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. et al., Composition and Antimicrobial activity of the Essential Oils of Two Origanum Species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 4168-4170
- Allahverdiyev A., Duran N., Ozguven M. and Kotlas S., Antiviral Activity of the Volatile Oils of Melissa officinalis L. against Hepres Simplex Virus Type 2, *Phytomedicine*, 2004; 11(7-8): 657-661
- Amarowicz R. and Pegga R. B., *European Journal of Lipid Science Technologies*, 2008; 110: 865-878
- American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J Am Diet Assoc* 1999; 9:1278–1285.
- Andreasen M.F., Landbo A.K., Cristensen L.P., et al., Antioxidant effects of phenolic rye (Secale cereale L.) extracts, monomeric hydroxycinnammates and ferrulic acid dehydrodimers on human low density lipoproteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49(8): 4090-4096
- Anonymous, *Hypericum perforatum*. *Alternative Medicine Review* 2004; 9(3): 318-325.

- Argyropoulou A., Samara P., Tsitsilionis O. and Skaltsa H, Polar Constituents of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their Cytotoxic/Cytostatic Activity, *Phytotherapy Research*, 2012; 26(12): 1800-1806
- Argyropoulou C., Papadatou M., Gregoriades K. et al., Carvacrol content of cultivated in North Greece *Origanum dictamnus* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009; 12
- Armata M., Gabrieli C., Termentzi A., Zervou M. and Kokkalou E., Constituents of *Sideritis syriaca*. *Spp syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant activity, *Food Chemistry*, 2008; 111(1): 179-186
- Awad R., Muhhamad A., Durst T., Trudeau V. and Arnason J. T, Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis*) using an in vitro measure of GABA transaminase activity, *Phytotherapy Research*, 2009; 23: 1075-1081
- Bagamboula C. F., Uyttendaele M., and Debevere J., Inhibitory Effects of Spices and Herbs Towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 2001
- Baily S., Ferrua B., Fay M. and Gourgerot-Pocidalo M.A., Interleukin 6 (IL-6), IL-1 α , IL- β and tumor necrosis factor (TNF- α) are four cytokines induced in monocytes by lipopolysaccharide (LPS); however, it is unclear whether the mechanisms which control their production are similar, *Cytokine*, 1990; 2(3): 205-210
- Baranauskiene R., Venskutonis R., Dewettinck K. and Verhe R., Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* C.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices, *Food Res. Int.*, 2006; 39: 413-425
- Bauersachs J., Bouloumie A., Fraccarollo D., et al., Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production, *Circulation* 1999; 100: 292-298
- Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., et al., Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, Inflammation and genetics, *Circulation*, 1995; 91:2488-2496

- Bertelli A.A.E., Migliori M., Panichi V., Longoni B., Origlia N., Ferretti A., et al., Oxidative Stress and Inflammatory Reaction Modulation by White Wine, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006
- Bladt S, Wagner H: Inhibition of MAO by fractions and constituents of *Hypericum* extract. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 7(suppl 1) 1994; 57-59
- Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L. and Uriarte E., Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity, 2005
- Bozin B., Mimica- Dukic N., Samojlik I. and Jovin E., Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55(19): 7879-7885
- Bravo L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr Rev*, 1998; 156: 317-333
- Briskin D. P., Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry And Physiology to Human Health. *Plant Physiology* 2002; 124: 507–514.
- Brown J.F., Chafee K.A., Tepperman B.L, Role of mast cells, neutrophils and nitric oxide in endotoxin- induced damage to the neonatal rat colon, *Br J Pharmacol*, 1998; 123: 31-38
- Brynskov J., Foegh F., Pedersen G., Ellevik C., Kirkegaard T., Bingham A. and Saermark T., Tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease, *Gut*, 2002; 51(1): 37-43
- Bucci L. R., Selected Herbals and Human Exercise Performance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72 (Suppl.): 624S–636S.
- Camejo-Rodrigues J., Ascensao L., Bonet M. A. et al., An Ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de Mamede (Portugal), *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 89: 199-209
- Capecka E., Mareczek A. and Leja M., Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species, *Food Chemistry*, 2005; 93(2): 223-226
- Carvalho A. M., *Etnobotanica del Parque Natural de Montessinho, Tradicion y Saber Popular en un Territorio del Nordeste de Portugal* Universidad Autonoma: Madrid, 2005

- Cassidy A., Hnasley B. and Lamuela-Raventos R.M., Isoflavones, lignanes and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health, *J Sci Food Agric*, 2000; 80:1044-1062
- Castelli P., Condemi A.M., Brambillasca C., et al., Improvement of cardiac function by allopurinol in patients undergoing cardiac surgery, *Cardiovasc Pharmacol*, 1995; 25: 119-125
- Chatzopoulou A, Karioti A., Gousiadou C., et al., Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro activity in clinical strains, *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58(10): 6064-6068
- Chen, C. and Kong, A. N., Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects, *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26 (6), 318-326.
- Cheynier V., Polyphenols in foods are more complex than often thought, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005; 81(1): 223-229
- Chorianopoulos N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G.J. and Haroutonian S. A., Essential Oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: Chemical composition and Antibacterial Activities Against Food-borne Pathogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52(26): 8261-8267
- Comalada M., Ballester I., Bailon E., Sierra S., Xaus J., Galvez J., Sanchez de Medina F. and Zarzuelo A., Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship, *Biochemical Pharmacology*, 2006; 72(8): 1010-1021
- Conforti F., Marrelli M., Menichini Fed., Tundis R., Statti G.A., Solimene U. and Menichini Frans., Chemical composition and protective effect of oregano (*Origanum heracleoticum* L.) ethanolic extract on oxidative damage and on inhibition of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2011; 26(3): 404-411
- Conolly J.D and Hill R., Triterpenes, *Natural Prod Rep*, 2007; 24: 465-486
- Coussens L.M. and Werb Z., *Nature*, 2002; 420:860
- Danpure C.J., Lactate Dehydrogenase and cell injury, *Cell Biochemistry and Function*, 2004

- Das D., Arber N. and Jankowski J.A., Chemoprevention of colorectal cancer, Digestion, 2007; 76: 51-67
- Dastmalchi K., Damien Dorman H. J., Oinonen P. P., Darwis Y., Laakso I and Hiltunen R., Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis*) extract, Food Science and Technology, 2008; 41: 391-400
- De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y., Fassotte M.F., Beguin F., et al., Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood I. Comparison with isolated PBMC stimulation, Cytokine, 1992; 4(3): 239-248
- Devasagayam T.P.A., Tilac J.C., Bloor K.K., Sane-Ketaki S., Ghaskadbi Saroj S. and Lele R.D, Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects, Journal of Association of Physicians of India, 2004; 52:796
- Dhawan K., Dhawan S., and Chhabra S., Attenuation of Benzodiazepine Dependence in Mice by a Tri-Substituted Benzoflavone Moiety of *Passiflora incarnate* Linneaus: A Non-Habit Forming Anxiolytic. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 2003; 6(2): 215–222.
- Dhawan K., Kumar S., and Sharma A., Anti-Anxiety Studies on Extracts of *Passiflora incarnate* Linneaus. Journal of Ethnopharmacology 2001; 78(2–3): 165–170.
- Dimitrova Z., Dimov B., Manolova N., Pancheva S., Ilieva D., and Shishkov S., Antiherpes Effect of *Melissa officinalis* L. Extracts. Acta Microbiologica Bulgarica 1993; 29: 65–72.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds., Food Chem, 2006; 97: 654-660
- Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R. and Tikkanen M.J., Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, Food Chemistry, 2003; 83(2): 255-262
- Dowlati Y., Hermann N., Swardfager W., Liu H., Sham L., Reim E.K. and Lanctot K.L., A meta-analysis of cytokines in major depression, Biol Psychiatry, 2010; 67(5): 446-457

- Dryden G. W. Jr, Deaciuc I., Arteel G. and McClain C. I. , Clinical Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy, *Curr: Gastroenterol Rep.*, 2005; 7(4): 308-314
- Dubiński A., Zdrojewicz Z, The role of interleukin-6 in development and progression of atherosclerosis, *Pol. Merkur. Lekarski* , 2007; 22(130): 291–4.
- Duthie G.G. and Brown K.M., Reducing the risk of cardiovascular disease, *Functional Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*, Chapman & Hall, NY, 1994; 19-38
- Eng J. L., Monkman D. A., Verhoef M. J., Ramsum D. L., and Bradbury J., Canadian Cancer Society Information Services: Lessons Learned about Complementary Medicine Information Needs. *Chronic Diseases in Canada* 2001; 22(3–4): 102–107
- Eonseon J., Polle J.E., Kum Lee H., Minhyun S. and Chang M., Xanthophylls in microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application, *J Microbiol Biotechnol*, 2003; 13(2): 165-174
- Erkan N., Ayranci G. and Ayranci E., Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, *Food Chemistry*, 2008; 110(1): 76-82
- Ernst E., Pittler M. H., and Stevinson C., Complementary/Alternative Medicine in Dermatology: Evidence-Assessed Efficacy of Two Diseases and Two Treatments. *American Journal of Clinical Dermatology* 2002; 3(5): 341–348.
- Ernst E., The Risk–Benefit Profile of Commonly Used Herbal Therapies: Ginkgo, St. John’s wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Annals of Internal Medicine* 2002; 136: 42–53.
- Febbraio M.A, Pedersen B.K., Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ?, *Exerc Sport Sci Rev* ,2005; 33(3): 114–119.
- Ferguson-Smith A.C, Chen Y.F, Newman M.S, May L.T, Sehgal P.B, Ruddle F.H., Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21, *Genomics*, 1988; 2(3): 203–208

- Figueredo G., Lepoirre M., Elleingand E. et al., Resveratrol: a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase , FEBS Lett, 1998; 421: 277-279
- Frankel E. N., Antioxidants, The oily Press Ltd, Dundee, Scotland, 1998
- Fremont L., Biological effects of resveratrol, Life Sciences, 2000; 66(8): 663-673
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei B., Tagizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., Chemical and Biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils, Food Chemistry, 2007; 102(3): 898-904
- Galati G., Sabzevari O., Wilson R., et al., Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics, Toxicology, 2002; 177: 91-104
- Geier F. P. and Konstantinowicz T., Kava Treatment in Patients with Anxiety. Phytotherapy Research 2004; 18(4): 297–300.
- Giordani C., Molinari A., Toccaceli L., Calcabrini A., Stringaro A., Chistolini P., Arancia G. and Diociaiuti M., Interaction of Tea Tree Oil with Model and Cellular Membranes. Journal of Medicinal Chemistry 2006; 49(15): 4581–4588.
- Gohil K.J., Kshirsagar S.B. and Sahane R.S., Ferrulic acid: a comprehensive pharmacology of an important bioflavonoid, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2012; 3(3)
- Gupta Y.K., Briyal S. and Chaudhary G., Protective effects of trans-resveratrol against kainic- acid induced seizures and oxidative stress in rats, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2002; 71(1-2): 245-249
- Halliwell B. and Cross C.E, Oxygen derived species: Their relation to human disease and environmental stress, Envir Health Perspect, 1994; 102:5-12
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., and Nielsen J. B., A Review of the Toxicity of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil. Food and Chemical Toxicology 2006; 44(5): 616–625.
- Harborne J.B. and Williams C.A., Review Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 2000; 55(6): 481-504
- Hart P. H., Brand C., Carson C. F., Riley T. V., Prager R. H., and Finlay J. J.- Jones., Terpene-4-ol, the Main Component of the Essential Oil of Melaleuca alternifolia (Tea Tree Oil), Suppresses Inflammatory Mediator Production by Activated Human Monocytes. Inflammation Research 2000; 49(11): 619–626.

- Hausen B. M. and Schulze R., Comparative Studies of the Sensitizing Capacity of Drugs Used in Herpes Simplex. *Dermatosen Beruf und Umwelt* 1986; 34(6): 163-170.
- Hausen B. M., Reichling J., and Harkenthal M., Degradation Products of Monoterpenes Are the Sensitizing Agents in Tea Tree Oil. *American Journal of Contact Dermatitis* 1999; 10(2): 68–77.
- Hazzit M. Baaliouamer A., Faleiro M. L. et al., Composition of the essential oils of Thymus and Origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006; 54: 6314-6321
- Hiroi S., Harada H., Nishi H., et al., Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRBI genes are associated with non-familial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 261: 332-339
- Ho C-T., Ferraro T., Chen Q., Rosen R.T. and Huang M-T., Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer-Preventive Properties, *Food Phytochemicals For Cancer Preventio II*, Chapter, 1994; 1: 2-19
- Hodges P. J. and Kam P. C. A., The Peri-Operative Implications of Herbal Medicines *Anaesthesia* 2002; 57: 889–899.
- Hodges P. J. and Kam P. C. A., The Peri-Operative Implications of Herbal Medicines. *Anaesthesia* 2002; 57: 1083–1089.
- Hougee S., Sanders A., Faber J., Graus Y.M.F., Van den Berg W.B., Garssen J., Friso Smit H., Hoiyer M.A., Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages, *Biochemical Pharmacology*, 2005; 69(2): 241-248
- Houston M., Estevez A., Chumley P., et al., Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling, *Biol Chem*, 1999; 274: 4985-4994
- Howard B. V. and Kritchevsky D., Phytochemicals and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association, 1997

- Huang Y-J., Zhang B.B., Ma N., Murata M., Tang A-Z. and Huang G-W., Nitritative and oxidative DNA damage as potential biomarkers for nasopharyngeal carcinoma, *Med Oncol.*, 2010
- Huiying Li, Miyahara T., Tezuka Y., Tran Q. Le, Seto H., and Kadota S., Effect of Berberine on Bone Mineral Density in SAMP6 as a Senile Osteoporosis Model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2003; 26(1): 110–111
- Hunt M. J. and Barnetson R. S., A Comparative Study of Gluconolactone versus Benzyl Peroxide in the Treatment of Acne. *The Australasian Journal of Dermatology* 1992; 33(3): 131–134.
- Inoue M., Sato E.F, Nishikawa M., et al., Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, *Curr Med Chem*, 2003; 10:2495-2505
- Jain A. and Basal E., Inhibition of Propionibacterium Acnes-Induced Mediators of Inflammation by Indian Herbs. *Phytomedicine* 2003; 10(1): 34–38.
- Jemal A., Siegel R., Ward Y., et al., Cancer Statistics, *Cancer J. Clin.*, 2008; 58: 71-96
- Johnson J. J. Carnosol: A promising anticancer and anti-inflammatory agent, *Cancer Lett*, 2001, 305(1-7)
- Juergens U.R, Stober M., Vetter H., Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro, *Eur J Med Res*, 1998; 3(11): 508-510
- Juergens U.R, Engelen T., Racke K., Stober M., Gillissen A. and Vetter H., Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes, *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 2004; 17(5): 281-287
- Kaliora A.C., Dedoussis G.V.Z. and Schmidt H., Dietary antioxidants in preventing atherogenesis, *Atherosclerosis*, 2005; 187(2006): 1-17
- Keddzia B., Antimicroorganism's activity of *Ol Chamomillae* and its components, *Herba Polonica*, 1991,; 37: 29-38
- Kehrer J. P., The Haber-Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity, *Toxicology*, 2000; 899:191-208
- Kelly F. J., Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease, *Journal of International Food Chemistry*, 1998; 10:21-23

- Kempuraj D, Madhappan B., Christodoulou S., Boucher W., Cao J., Papadopoulou N., Cetrulo C.L., Theoharides T.C., Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells, *British Journal of Pharmacology*, 2009
- Keys A., Mediterranean diet and public health: personal reflections. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995;61:1321S–1323S.
- Khuhaprema T. and Strivatanakuli P., Colon and rectum cancer in Thailand: an overview, *Jpn J. Clin Oncol.*, 2008; 38: 237-243
- Kim, H. J., Yum K. S., Sung J. H., Rhie D. J., Kim M. J., Min D. S., Hahn S. J., Kim M. S., Jo Y. H., and Yoon S. H., Epigallocatechin-3-gallate increases intracellular $[Ca^{2+}]$ in U87 cells mainly by influx of extracellular Ca^{2+} and partly by release of intracellular stores. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2004; 369:260-267.
- Kinjo J., Nagao T., Tanaka T., Nonoka G- I., Okawa M., Nohara T., and Okabe H., Activity-Guided Fractionation of Green Tea Extract with Antiproliferative Activity Against Human Stomach Cancer Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25(9): 1238–1240
- Kiselova Y, Ivanova D, Chervenkov T, et al. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs., *Phytotherapy Res*, 2006; 20: 961-965
- Kleijnen J, Knipschild P: Ginkgo biloba. *Lancet* 1992; 340:1136-1139,
- Koetter U., Schrader E., Kaufeler R., and Brattstrom A., A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Prospective Clinical Study to Demonstrate Clinical Efficacy of a Fixed Valerian Hops Extract Combination (Ze 91019) in Patients Suffering from Non- Organic Sleep Disorder. *Phytotherapy Research* 2007; 21(9): 847–51.
- Kokkini S., Hanlidou E., Karousou R. and Lanaras T., Clinal Variation of *Mentha pulegium* Essential oils along the climatic Gradient of Greece, *Journal of Essential Oil Research*, 2004; 16(4): 588-593
- Koleva I., Linssen J. P. H., A van Beek T., Evstatieva L., Kortenska V. and Handijieva N., Antioxidant activity screening on extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria , *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003; 83(8): 809-819

- Kontogiorgis C. and Hatjipavlou- Litina D., Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Coumarin Derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005; 48(20):6400-6408
- Kovacik J. and Repcak M., Accumulation of coumarin- related coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* related to sample processing, *Food Chemistry*, 2008; 111(3):755-757
- Koytchev R., Alken A. G., and Dundarov S., Balm Mint Extract (Lo-701) for Topical Treatment of Recurring Herpes Labialis. *Phytomedicine* 1999; 6(4): 225–230.
- Kristiansen O.P, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?, *Diabetes* , 2005; 54 Suppl 2: S114–24.
- Lacy A. and O’Kennedy R., Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr Pharm Des*, 2004; 10: 3797-3811
- Lee J., Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinaceae purpurea products, *Journal of Functional Foods*, 2010; 2(2): 158-162
- Lee J., Koo N. and Min D. B. Reactive Oxygen Species, Aging and Antioxidative Nutraceuticals, 2006
- Lee S-J., Umano K., Shibamoto T. and Lee K-G., Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties, *Food Chemistry*, 2005; 91(1): 131-137
- Lelli J.L., Becks L.L., Dabrowska M.I., Hinshaw D.B., ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells, *Free Radic Biol Med*, 1998; 25(6): 694-702
- Leventin E.and McMahon K., *Plants and Society*, 3rd edition: A Review of the history and importance of plant usage including the usage of plants as medicines, Iowa, USA, 2003
- Lima C. F., Andrade P. B, Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M. and Pereira-Wilson C., The drinking of *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 97(2):383-389
- Lin Y. T., Kwon Y. I., Labbe R. G. and Shetty K., Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated Urease by Oregano and Cranberry phytochemical Synergies,

- Department of Food Science, Chenoweth Laboratory, University of Massachusetts, 2005
- Liolios C. C., Gortzi O., Lalas S. et al., Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity, *Food Chemistry*, 2009; 112: 77-83
- Liu J. P., Manheimer E., and Yang M., Herbal Medicines for Treating HIV Infection and AIDS. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005; 3: CD003937
- Liu J., Li X., Yue Y., Li J., He T., He Y., The Inhibitory Effect of Quercetin on IL-6 Production by LPS- Stimulated Neutrophils, *Cellular & Molecular Immunology*, 2005; 2(6)
- Liu R.H., Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action, *J Nutr*, 2004; 134: 3479-3485
- Locksley R.M., Killeen N. and Lenardo M.J., The TNF and TNF-receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell*, 2001; 104(4): 487-501
- Lu Y. and Foo Y., Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*), *Food Chemistry*, 2001; 75(2): 197-202
- Lyu S-Y. and Park W-B., Production of Cytokine and NO by RAW 264.7 Macrophages and PBMC In Vitro Incubation with Flavonoids, *Springer Link*, 2005; 28(5): 573-581
- Mahboubi M. and Haghi G., Antimicrobial Activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil, *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 119(2): 325-327
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. and Jimenez L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004; 79: 727-747
- Mansky P. J. and Wallerstedt D. B., Complementary Medicine in Palliative Care and Cancer Symptom Management. *Cancer Journal* 2006; 12(5): 425–431.
- Mantovani A., Cancer-related Inflammation: The seventh hallmark of Cancer, *American Society of Clinical Oncology*, 2009
- Mayne S.T., Antioxidant Nutrients and Chronic Diseases: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative stress Status in Epidemiologic Research, *Journal of Nutrition*, 2003; 133:933-940

- Menghini L., Massarelli P., Bruni G. and Menghini A., Preliminary Evaluation on Anti-inflammatory and Analgesic Effects of *Sideritis syriaca* L. herbal Extracts, *Journal of Medicinal Food*, 2005; 8(2): 227-231
- Meredith M. J., Herbal Nutraceuticals: A Primer for Dentists and Dental Hygienists. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2001; 2(2): 1–15.
- Michaelsson G., Juhlin L., and Vahlquist A., Effects of Oral Zinc and Vitamin A in Acne. *Archives of Dermatology* 1977; 113(1): 31–36.
- Miles E.A, Zoubouli P, Calder P.C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 2005; 21:389-94
- Milner J.A., Reducing the risk of cancer., *Functional Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*, Chapman & Hall, NY, 1994; 39-70
- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M. and Simin N., Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L (Lamiaceae) essential oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52(9): 2485-2489
- Mitjavila M.T. and Moreno J.J, The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases, *Biochemical Pharmacology*, 2012; 84(9):1113-1122
- Miura K., Kikuzaki H. and Nakatani N., Antioxidant activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the Oil Stability Index Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50(7): 1845-1851
- Molan P. C., Potential of Honey in the Treatment of Wounds and Burns. *American Journal of Clinical Dermatology* 2001; 2(1): 13–19.
- Momtaz, Saeideh, Abdollahi and Mohammad, An update on pharmacology of *Satureja* species; from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and antihyperlipidemic to reproductive stimulation, University of Pretoria (Library services), 2010
- Mucsi I., Gyulai Z., and B'el'adi I., Combined Effects of Flavonoids and Acyclovir against Herpesviruses in Cell Cultures. *Acta Microbiologica Hungarica* 1992; 39(2): 137–147

- Muller WE, Roli M, Schafer C, et al: Effects of Hypericum extract (LI 160) on biochemical models of antidepressant action. *Pharmacopsychiatry* 30(suppl 2) 1997; 102-107
- Murti K., Panchal M. A., Gajera V. and Solanki J., Pharmacological properties of *Matricaria recutita*: A Review, *Pharmacologia*, 2012; 3(8)
- Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis., *J Pharmac Biomed Anal*, 2006; 41:1523-1542
- Nair M.P., Mahajam S., Reynolds J.L., Aalimkhanlu R., Nair H., Schwarz S.A., Kandaswami C., The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System, *Clinical and Vaccine Immunology*, 2005
- Nascimento, Gislene G. F., Locatelli, Freitas J., Silva P. C., Giuliana L., Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Brazilian Journal of Microbiology*, 2000; 31:247-256
- Nishimoto N., Interleukin-6 in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(3): 277–281.
- Nolkemper S., Reichling J., Stintzing F. C., Carle R., and Schnitzler P., Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 In Vitro. *Planta Medica* 2006; 72(15): 1378–1382.
- Novais M. H., Santos I., Mendes S. et al., Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrábida Natural Park, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 93: 183-195
- O'Hara M. A., Kiefer D., Farrell K., and Kemper K., A Review of Twelve Commonly Used Medicinal Herbs. *Archives of Family Medicine* 1998; 7:523–536.
- Ocana-Fuentes A., Arranz-Gutierrez E., Senorans F.J. and Reglero G., Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages, *Food and Chemical Toxicology*, 2010; 48(6): 1568-1575
- Oh J., Jo H., Reum-Cho A., Kim S-J. and Han J., Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas, *Food Control*, 2012; 31(2): 403-409

- Owlia P., Rasaoli I. and Saderi H., Antistreptococcal and antioxidant activity of Essential Oil from *Matricaria chamomilla* L., *Research Journal of Biological Sciences* 2007; 2(2): 155-160
- Pan C. Y., Kao Y. H., and Fox A. P., Enhancement of inward Ca (2+) currents in bovine chromaffin cells by green tea polyphenol extracts. *Neurochem.* 2002; Int. 40: 131-137.
- Pan M-H. and Ho C-T., *Chem Soc Rev*, 2008; 37:2558
- Pan M-H., Lai C-S. and Ho C-T., Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids, *Food and Function (Review)*, 2010; 1:15-31
- Papadopoulou A., and Frazier R. A., Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Science Technology*. 2003;5:186-190.
- Park E.J. and Pezzuto J.M, Botanicals in cancer chemoprevention, *Cancer Met Rev*, 2002; 21(3-4):231-255
- Patrick L. and Uzick M., Cardiovascular Disease: C-Reactive Protein and the Inflammatory Disease Paradigm: HMG-CoA Reductase Inhibitors, Alpha-Tocopherol, Red Yeast Rice and Olive Oil Polyphenols, A Review of Literature, *Alternative Medicine Review*, 2001; 6(3): 248-271
- Peters J.L., Castillo F.J. and Heath RL. Alteration of extracellular matrix enzymes in pinto leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiol*, 1999; 121: 159–164.
- Petreska J., Stefova M., Ferreres F., Moreno D. A., Tomas-Barberan F. A., Stefkov G., Kulevanova S. and Gil-Izquierdo A., Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal “Mountain Tea”, *Food Chemistry*, 2011; 125(1):13-21
- Pittler M. H. and Ernst E., Kava Extract for Treating Anxiety. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003; (1):CD003383.
- Politeo O., Jukic M. and Milos M., Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plant, *Croatia Chem. Acta*, 2006; 79: 545-552
- Prior R. L. and Cao G., Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components Of Teas: Implications for Altering in vivo Antioxidant Status, *Soc Exper Biol Med*, 1999; 220(4): 255-261

- Proestos C, Kapsokefalou M. and Komaitis M., Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plant by RP-HPLC and GC-MS after silylation, *J. Food Qual.*, 2008; 31: 402-414
- Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G. J. E. and Komaitis M., RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2005; 53(4): 1190-1195
- Qadan F., Thewaini A. J., Ali D. A., Afifi R., Elkhawad A., and Matalka K. Z., The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* Leaf Extracts to Acne-Developing Organisms. *The American Journal of Chinese Medicine* 2005; 33(2): 197–204.
- Ray B. and Kahiri D.K., *Curr Opin Pharmacol*, 2009; 9:434
- Reddy S., Rishi A. K., Xu H., Levi E., Sarkar F. H., and Majumdar A. P., Mechanisms of Curcumin- and EGF-Receptor Related Protein (ERRP)-Dependent Growth Inhibition of Colon Cancer Cells, *Nutrition and Cancer* 2006; 55(2): 185– 194.
- Rekka E.A., Kourounakis A. P. and Kourounakis P. N., Investigation of the effects of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1994; 92(3): 361-364
- Rice-Evans C. A., Miller N. I., Papanga J., et al., Structure –antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids, *Free Rad Biol. Med.*, 1996; 20: 933-956
- Rickard A. H., Lindsay S., Lockwood G. B., and Gilbert P., Induction of the mar Operon by Miscellaneous Groceries. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 97(5): 1063–1068
- Riedemann N.C, Guo R.F, Hollmann T.J., Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis, *FASEB J.*, 2004;18: 370-382.
- Ritchie M.R., Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: what do we know about their pattern of usage?, *Proc Nutr Sci*, 2007; 66:479-482
- Robards K., Prenzler P.D, Tucker D, et al., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 1999; 66(4):401-436
- Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selima K.A.H. and Khalel K.I., Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus*

- vulgaris L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts, *Industrial Corps and Products*, 2013, 43: 827-831
- Rodrigo R., Miranda A. and Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease, *Clinica Chimica Acta*, 2011; 412:410-424
- Romero-Jimenez M., Campos-Sanchez J., Analla M., Munoz-Serrano A. and Alonso-Moraga A., Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs, *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental mutagenesis*, 2005; 585(1-2): 147-155
- Ross J.A. and Kasum C.M., Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety, *Ann Rev Nut*, 2002; 22:19-34
- Russo M., Galletti G. C., Bocchini P. et al., Essential oil compound of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) letswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. I. Influences., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998; 46: 3741-1746
- Saddique Z., Naeem I. and Maimoona A., A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L., *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 131: 511-521
- Said E.A., Dupuy F.P., Trautmann L., Zhang Y., Shi Y., El-Far M., Hill B.J., Noto A., Amcuta P., et al., Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T-cell activation during HIV infection, *Nat Med*, 2010; 16(4): 452-459
- Salway J.G., *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά*, Β' Έκδοση, Blackwell Publishing, 2006, Σελίδα 49.
- Sanchez-Moreno C., Jimenez-Escrig A. and Saura-Calixto F., Study of low density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols, *Nutrition*, 2000; 20(7): 941-953
- Sandstorm P.A., Pardi D., Tebbey P.W., Dudec R.W, Terrian D.M, Folks T.M., Buttke T.M, Lipid Hyperoxide induced Apoptosis: Lack of Inhibition by Bcl-2 Orer-Expression, *FEBS Letters*, 1995; 365(1):66-70
- Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesì C. and Masella R., Polyphenols, intracellular signaling and inflammation, *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43(4): 394-405

- Santos- Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P.B. and Fernandes-Ferreira M., Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis*), *Plant Science*, 2002; 162(2): 981-987
- Segrest J. P, Jones M.K., De Loof H. and Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins, *Journal of Lipid Research*, 2001; 42: 1346-1367
- Seifried H.E, Anderson D.E, Fisher E.I, Milner J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 2007, 18: 567-579
- Shan B, Yizhong YZ, Sun M, et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents., *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 7749-7759
- Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., and Corke H., The In Vitro Antibacterial Activity of Dietary Spice and Medicinal Herb Extracts. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 117(1): 112–119
- Shetty K., and Wahlqvist M. L.,. A model for the role of proline-linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific J. Clin. Nutrition* 2004; 13:1-24.
- Singh U. and Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis, *Pathophysiology*, 2006; 13:129-142
- Skibola C.F. and Smith M.T., Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radical Biology and Medicine*, 2000; 29(3-4): 375-383
- Smith P.C., Hobisch A., Lin D.L. , Culig Z., Keller E.T., Interleukin-6 and prostate cancer progression, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001; 12 (1): 33–40.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1999;11:287–313.
- Soobrattee M.A, Neerqheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O., Bahorum T., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism + actions, *Mutat Res.*, 2005; 579(1-2): 200-213
- Sparagna G.C., Hickson-Bick D.L., Cardiac fatty acid metabolism and the induction of apoptosis, *Am J Med Sci*, 1999; 318: 15-21

- Stadtman E.R. and Levine R.L., Protein oxidation, *Ann N.Y Acad Sci*, 2000; 899:191-208
- Stamatis G., Kyriazopoulos P., Golegou S. et al., In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 88: 175-179
- Stoyanova A., Georgiev E., Kula I. and Majda T., Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria, *Journal of Essential Oil Research*, 2005; 17(5): 475-476
- Strivastava J., Lambert J. and Vietmeyer N., *Medicinal Plants: An Expanding Role in Development*, 1996; World Bank Technical Paper
- Subrahmanyam M., A Prospective Randomized Clinical and Histological Study of Superficial Burn Wound Healing with Honey and Silver Sulfadiazine. *Burns* 1998; 24(2): 157–161.
- Subrahmanyam M., Honey Impregnated Gauze versus Polyurethane Film (OpSite) in the Treatment of Burns—A Prospective randomized Study. *British Journal of Plastic Surgery* 1993; 46(4): 322–323.
- Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, et al: Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Medica* 1984; 50:272-274,
- Swardfager W., Lanctot K., Rothenburg L., Wang A., Cappell J. and Herrmann N., A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease, *Biol Psychiatry*, 2010; 68(10): 930-941
- Taiz L. and Zeiger E., *Plant Phytology*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, 2006
- Takeuchi H, Lu Z.-G. and Fujita T., New monoterpene Glucoside from the Aerial Parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) , *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 2004; 68(5): 1131-1134
- Tegos G., Stermitz F. R., Lomovskaya O., and Lewis K., Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(10): 3133–3141
- Thiede HM, Walper A: Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 7 (suppl 1)1994; 54-56

- Thompson Coon J. and Ernst E., Systematic Review: Herbal Medicinal Products for Non-Ulcer Dyspepsia. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 2002; 16: 1689–1699.
- Todorova M. N., Christov R. C. and Evstatieva L. N., Essential Oil composition of Three sideritis Species from Bulgaria, *Journal of Essential Oil Research*, 2000; 12(4): 418-420
- Toguri T, Umemoto N. and Ohtani T. Activation of anthocyanin by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450. *Plant Mol Biol* 1993; 23:933–946.
- Triantaphyllou K., Blekas G. and Boskou D., Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species of Lamiaceae, *International Journal of Food Sources and Nutrition*, 2001; 52(4): 313-317
- Tsao R., Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2010; 2(12): 1231-1246
- Turner M., Londei M. and Feldman M., Human T-cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor, *European Journal of Immunology*, 2005; 17(12): 1807-1814
- Ulrich-Merzenich G., Zeitler H., Vetter H. and Kraft K. Synergy research: Vitamins and secondary plant components in the maintenance of the redox homeostasis and in cell signaling, *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2009; 16:2-16
- Van den Bout-van den Beukel C. J., Koopmans P. P., Van der Ven A. J., De Smet P. A., and Burger D. M., Possible Drug–Metabolism Interactions of Medicinal Herbs with Antiretroviral Agents. *Drug Metabolism Reviews* 2006; 38(3): 477–514.
- Van der Poll T., Keogh C.V., Guirao X., Buurman W.A, Kopf M., Lowry S.F., Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia, *J Infect Dis*, 1997; 176 (2): 439–444.
- Vattem, D. A., Lin Y.-T., Ghaedian R., and Shetty K., Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochem* 2005 ;40:1583-1592.

- Verma K. C., Saini A. S., and Dhamija S. K., Oral Zinc Sulphate Therapy in Acne Vulgaris: A Double-Blind Trial. *Acta Dermato-Venereologica* 1980; 60(4): 337–340.
- Vgi E., Rapavani E., Hadolin M., Perdi K. V., Balzs A., Blzovics A. and Simndi, Phenolic and Triterprnoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different solvents, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2005; 53(1): 17-21
- Vilar S., Quezada E., Santana L., Uriarte E., Yanez M., Fraiz N., Alcaide C., Cano E. and Orallo F., Design, synthesis and vasorelaxant and platelet anti-aggregatory activities of coumarin-resveratrol hybrids, *Bioorganic And Medicinal Chemistry Letters*, 2006; 16(2): 257-261
- Vingtdeux V., Dreses-Werringloer U., Zhao H., Davies P. and Marambaud P., *BMC Neuroscience*, 2008; 9(2): S6
- Vinson J.A., Flavonoids in Foods as in vitro and in vivo Antioxidants, *Adv Exp Med Biol*, 1998; 439:151-164
- Visioli F., Galli C., Plasmati E. et al., Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress, *Circulation*, 2000; 102: 2169-2171
- Volz H. P. HP and Kieser M., Kava Kava Extract WS 1490 versus Placebo in Anxiety Disorders—A Randomized, Placebo-Controlled Twenty-Five-Week Outpatient Trial. *Pharmacopsychiatry* 1997; 30(1): 1–5.
- W K. and Ernst E., Herbal Medicines for Treatment of Bacterial Infections: A Review of Controlled Clinical Trials. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51:241–246.
- Wang H., Cao G. and Prior R.L., Total antioxidant capacity of fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996; 44: 701-705
- Wang W., Wu N., Zu Y. G. and Fu Y. J., Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, *Food Chemistry*, 2008; 108(3): 1019-1022
- Wargovich M. J., Woods C., Hollis D. M. and Zander M. E., Herbals, Cancer Prevention and Health. *The Journal of Nutrition* 2001; 131 (Supl.): 3034S–3036S.

- Wei Zheng and Shiow Y. Wang, Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49(11): 5165-5170
- Weimar V. H., Puhl S. C., Smith W. H., and TenBroeke J. E., Zinc Sulfate in Acne Vulgaris. *Archives of Dermatology* 1978; 114(12): 1776–1778.
- White K. P. *Professional Psychology: Research and Practice*, 2009; 40(6): 633-640
- Williams R. J., Spencer J. P. and Rice-Evans C. A., Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? , *Free Rad Biol. Med.*, 2004; 36(7): 838-849
- Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(suppl):243S–55S.
- Winston J. C., Health-Promoting Properties of Common Herbs. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 1999; 70 (Supl.): 491S–499S
- Wisman K.N., Perkins A., Jeffers M.D. and Hagerman A.E., Accurate Assessment of the Bioactivities of Redox-Active Polyphenolics in Cell Culture, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 2008; 56(17), pp 7831–7837
- Xiuzhen H., Tsao S. and Hongxiang L., Dietary polyphenols and their biological significance, *Int. J. Mol. Sci*, 2007; 8: 950-988
- Yeh S-L., Wang M., Chen P-Y and Wu T-C., Interactions of β -carotene and flavonoids on the secretion of pro-inflammatory mediators in an in vitro system, *Chemico-Biological Interaction*, 2009; 179(2-3): 386-393
- Yoon W-J., Lee N.H. and Hyun C-G., Limonene suppresses Lipopolysaccharide-Induced Prosduction of Nitric Oxide, Prostaglandin E2 and Pro-inflammatory Cytokines in RAW264.7 Macrophages, *Journal of Oleo Science*, 2010; 59(8): 415-421
- Young I.S. and Woollside J.V., Antioxidants in Health and Disease, *Journal of Clinical Pathology*, 2001; 54:176-186
- Zhang S.Y., Meng L., Gao W.Y., Song N.N., Jia W. and Duan H.Q., Advances on biological activities of coumarins, *Europe Pubmed Central*, 2005; 30(6): 410-414
- Zhao L., Wu J., Yang J., Wei J., Gao W. and Guo C., Dietary quercetin supplementation increases serum antioxidant capacity and alters hepatic gene expression profile in rats, *Experimental Biology and Medicine*, 2011

Ελληνική Βιβλιογραφία- Βιβλία

- Δαφερέρα Δ., Ταραντίλης Π. Α. και Πολυσίου Μ., Θυμάρι(Thyme): Φαρμακολογική-Βιολογική δράση, 2006, Εργαστήριο Χημείας, Γενικό Τμήμα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία παθολογίας Τόμος II, Αντώνιος Ζαμπέλας, 2007, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης
- Παθολογική Φυσιολογία, Stephen McFee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, 2006, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
- Παθοφυσιολογία, Ivan Damjanov, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, 2009, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου
- Σαββίδης. Το Μαστιχόδενδρο της Χίου (Pistacia lentiscus var Chia), 2000. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α. Ε.
- Τουμπανάκης Δ. & Βασιλακοπουλος Θ., Μοριακοί Μηχανισμοί Δράσης της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6), Πνευμων Τεύχος 2, 2007; 20: 142-153
- Χημεία Τροφίμων Δ' Έκδοση, Δ. Μπόσκου, 1997 , σελίδες: 183-184. Εκδόσεις Γαρταγάνη,
- Χημεία Τροφίμων, Ε' Έκδοση, Δ. Μπόσκου, 2004, σελίδες: 221-227. Εκδόσεις Γαρταγάνη,