



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ  
ΑΠΟ ΤΑ ΓΕΝΗ *MENTHA*, *SIDERITIS* ΚΑΙ *SALVIA* ΣΤΗΝ  
ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ  
ΜΗΤΡΑΣ (HeLa)

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΚΡΕΑΤΣΟΥΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΓΕΝΗ  
*MENTHA*, *SIDERITIS* ΚΑΙ *SALVIA* ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (HeLa)**

**STUDY OF THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS OF THE GENERA  
*MENTHA*, *SIDERITIS* AND *SALVIA* ON THE GROWTH OF CERVICAL  
CANCER CELLS (HeLa)**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων):** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Καλλιόπη Λιαδάκη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Στάγκο Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία και την υποστήριξη που μου παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την πραγματοποίηση την πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο που διευθύνει μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον, καθώς επίσης και την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τη Θάλεια Κερασιώτη για τη βοήθειά της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου για την αγάπη τους και την αμέριστη ψυχολογική και οικονομική τους στήριξη τα τέσσερα αυτά χρόνια των σπουδών μου και θα ήθελα να τους αφιερώσω αυτήν την εργασία.

## Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα πρόβλημα, που μαστίζει τις σύγχρονες κοινωνίες του δυτικού κυρίως κόσμου, αποτελώντας τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά την αθηροσκλήρωση. Βλαπτικοί παράγοντες που αποτελούν αιτίες του θεωρούνται διάφορες χημικές ουσίες, η ακτινοβολία, ογκογόνοι ιοί, ενώ αιτία επίσης του καρκίνου μπορούν να αποτελέσουν και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς και οι αυθόρμητες μεταλλάξεις.

Μεταξύ του γυναικείου πληθυσμού ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο καρκίνου, μετά τον καρκίνο του μαστού.

Καθώς το πρόβλημα του καρκίνου λαμβάνει όλο και μεγαλύτερη έκταση και οι συμβατικές χημειοθεραπευτικές μέθοδοι εμφανίζονται πολλές φορές αναποτελεσματικές, τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει προσανατολιστεί προς νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Τέτοιες προσεγγίσεις είναι για παράδειγμα η ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων, οι οποίοι προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής μας διατροφής.

Ανάμεσα στους κύριους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες συγκαταλέγονται και οι πολυφαινόλες. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση 18 φυτικών εκχυλισμάτων, από τα γένη *Mentha* (μέντα), *Salvia* (φασκόμηλο) και *Sideritis* (τσάι του βουνού) στην αύξηση καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), καθώς τα εκχυλίσματα από τα συγκεκριμένα γένη εμφανίζουν γενικά υψηλό φαινολικό φορτίο. Η εκτίμηση της δράσης τους έγινε με τη μέθοδο του XTT, ενώ αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικές με τα παραπάνω γένη φυτών υπάρχουν κυρίως για άλλα είδη από αυτά με τα οποία ασχολήθηκε η παρούσα μελέτη και στοχευμένα σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HeLa με τιμές  $IC_{50}$  που κυμαίνονταν από 110 έως 1075  $\mu\text{g/mL}$ . Ισχυρότερη δράση παρουσίασαν τα υδατικά εκχυλίσματα από *Salvia argentea*, *Salvia pomifera calveina* και *Mentha longifolia* με  $IC_{50}$ =110, 260 και 287  $\mu\text{g/mL}$  αντίστοιχα. Έτσι, τα παραπάνω εκχυλίσματα υποδηλώνουν μια πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση. Για να θεωρηθούν όμως ως αξιόπιστοι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες θα πρέπει να ακολουθήσουν και άλλες μελέτες σε άλλες καρκινικές σειρές.

# Περιεχόμενα:

---

Περίληψη	5
Περιεχόμενα	6
Περιεχόμενα Εικόνων	8
Περιεχόμενα Πινάκων	9
Περιεχόμενα Γραφημάτων	9

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

1.1.1. Γενικά	11
1.1.2. Καρκινογένεση	11
1.1.3. Η θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης	12
1.1.4. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	13

### **1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ**

1.2.1. Γενικά	17
1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	18

### **1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

1.3.1. Γενικά	23
1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών	24
1.3.2.1. Φλαβονοειδή	24
1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή	26
1.3.3. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών	28

### **1.4. ΧΕΙΛΑΝΘΗ**

1.4.1. Η οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae)	29
--	----

1.4.2. Φασκόμηλο ( <i>Salvia spp.</i> )	
1.4.2.1. Βοτανικά στοιχεία	30
1.4.2.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	32
1.4.3. Μέντα ( <i>Mentha spp.</i> )	
1.4.3.1. Βοτανικά στοιχεία	34
1.4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	36
1.4.4. Τσάι του βουνού ( <i>Sideritis spp.</i> )	
1.4.4.1. Βοτανικά στοιχεία	37
1.4.4.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	39
<b>1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ</b>	<b>40</b>
<b><u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>	
<b>2.1. ΥΛΙΚΑ</b>	
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	40
2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	41
2.1.3. Εκχυλίσματα	42
<b>2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa	43
2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ	
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	43
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	44
2.2.3. Στατιστική ανάλυση	45
<b><u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	<b>46</b>
<b><u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	<b>58</b>
<b><u>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	<b>63</b>

## Περιεχόμενα εικόνων

- Εικόνα 1:** τράχηλος σε σχέση με το άνω μέρος του κόλπου και το οπίσθιο τμήμα της μήτρας. \_\_\_\_\_ 13
- Εικόνα 2:** HeLa κύτταρα από καλλιέργεια του εργαστηρίου όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο. \_\_\_\_\_ 17
- Εικόνα 3:** Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράση χημειοπροστατευτικών. \_\_\_\_\_ 23
- Εικόνα 4 :** Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών. \_\_\_\_\_ 26
- Εικόνα 5:** α) χημική δομή φερουλικού οξέος (ανήκει στα υδροξυκινναμικά οξέα), β) ελλαγικό οξύ (ανήκει στα υδροξυβενζοϊκά οξέα), γ) ματαιρεσινόλη (λιγνάνιο) και δ) ρεσβερατρόλη (στιλβένιο) \_\_\_\_\_ 28
- Εικόνα 6:** α) *Salvia officinalis*, β) *Salvia fruticosa*, γ) *Salvia pomifera*  
δ) *Salvia Sclarea* και ε) *Salvia Argentea* \_\_\_\_\_ 32
- Εικόνα 7:** α) *Mentha piperita*, β) *Mentha viridis*, γ) *Mentha pulegium*  
δ) *Mentha longifolia* και ε) *Mentha aquatic* \_\_\_\_\_ 36
- Εικόνα 8:** α) *Sideritis raeseri*, β) *Sideritis syriaca* (μαλοτήρα),  
γ) *Sideritis athoa* και δ) *Sideritis euboea* \_\_\_\_\_ 39
- Εικόνα 9 :** μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα. \_\_\_\_\_ 44
- Εικόνα 10 :** α) αντικειμενοφόρος πλάκα *Neubauer* και καλυπτρίδες, β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του \_\_\_\_\_ 45



## Περιεχόμενα πινάκων

**Πίνακας 1.** Εκχυλίσματα από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* και το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (TPC)\_\_\_\_\_42

## Περιεχόμενα γραφημάτων

**Γράφημα 1:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*\_\_\_\_\_48

**Γράφημα 2:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*.\_\_\_\_\_49

**Γράφημα 3:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calveina*.\_\_\_\_\_49

**Γράφημα 4:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa*.\_\_\_\_\_50

**Γράφημα 5:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica* \_\_\_\_\_50

**Γράφημα 6:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestina* \_\_\_\_\_51

**Γράφημα 7:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*.\_\_\_\_\_51

**Γράφημα 8:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia argentea*.\_\_\_\_\_52

**Γράφημα 9:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloponnesiaca*\_\_\_\_\_52

<b>Γράφημα 10:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Sideritis clandestina peloponnesiaca</i> .	53
<b>Γράφημα 11:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το υδατικό εκχύλισμα του <i>Sideritis raeseri raeseri</i> .	53
<b>Γράφημα 12:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Sideritis raeseri raeseri</i> .	54
<b>Γράφημα 13:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το υδατικό εκχύλισμα της <i>Mentha longifolia</i> .	54
<b>Γράφημα 14:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το υδατικό εκχύλισμα της <i>Mentha pulegium pulegium</i> .	55
<b>Γράφημα 15:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia sclarea</i> .	55
<b>Γράφημα 16:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia officinalis</i> .	56
<b>Γράφημα 17:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia calveina</i> .	56
<b>Γράφημα 18:</b> Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων <i>HeLa</i> από το μεθανολικό εκχύλισμα του <i>Salvia pomifera pomifera</i> .	57
<b>Γράφημα 19:</b> Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών $IC_{50}$ .	58
<b>Γράφημα 20:</b> Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές $IC_{50}$ και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.	58

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.1.1. Γενικά

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η προέλευση της λέξης καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως ο «πατέρας της ιατρικής». Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε τους όρους «καρκίνος» και «καρκίνωμα» για να περιγράψει διάφορους όγκους που εμφάνιζαν εσωτερικά ή εξωτερικά έλκη και διογκώσεις. Στην ελληνική γλώσσα οι λέξεις αυτές αναφέρονται στα καβούρια, τα οποία θυμίζουν τον καρκίνο, μιας και οι ακτινωτές μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων, θυμίζουν τη μορφή που έχουν τα πόδια και οι δαγκάνες των καβουριών.

### 1.1.2. καρκινογένεση

Καρκινογένεση ορίζεται ως η διαδικασία γένεσης- δημιουργίας του καρκίνου. Ο οργανισμός λειτουργώντας σαν ένα καλορυθμισμένο ρολόι γνωρίζει πότε είναι η σωστή χρονική στιγμή για την παραγωγή νέων κυττάρων, την ανανέωση παλιών κυττάρων ή τον «θάνατο» φθαρμένων κυττάρων. Ωστόσο, το ρολόι αυτό ορισμένες φορές απορυθμίζεται και ως συνέπεια έχουμε υπερπαραγωγή κυττάρων τα οποία καθώς φυσιολογικά δε χρειάζονται στον οργανισμό, σχηματίζουν μία ανώμαλη μάζα, τον όγκο. Αιτία αυτής της απορύθμισης και επομένως και προϋπόθεση της καρκινογενετικής διαδικασίας αποτελεί η βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να προξενήσουν βλάβες στο γενετικό υλικό: χημικές ουσίες, ακτινοβολία και ογκογόνοι ιοί (Ames B.N. et al, 1995). Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι συνήθως για την μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό επιδρούν περισσότεροι του ενός βλαπτικοί παράγοντες.

### 1.1.3. Η θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης

Αποδεδειγμένα πλέον η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό με ικανότητα μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενο ιστό είναι μία διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται ως πολυσταδιακή (Cairns J, 1975). Τα γενικά στάδια τα οποία θεωρείται ότι ακολουθεί η καρκινογενετική διαδικασία είναι η έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η πρόοδος (progression) (Baer – Dubowska et al., 2006, Bode & Dong, 2006, Trosko J. E., 2006).

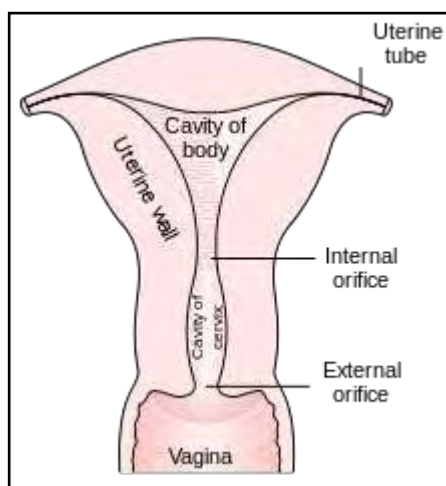
- Κατά το πρώτο στάδιο (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας, έχουμε την πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγεννήτορα (Potter V.R., 1981). Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται κατά πάσα πιθανότητα μετάλλαξη σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα που διατηρεί κάθε κύτταρο να διαφοροποιηθεί, δημιουργώντας έτσι ένα κύτταρο το οποίο έχει μεταλλαχθεί με τέτοιον τρόπο, ώστε να μπορεί συνεχώς να αυτοανανεώνεται ή να εισέρχεται στη φάση της μίτωσης με συχνότητα μεγαλύτερη του φυσιολογικού (Trosko J.E. and Chang C.C., 1989).
- Κατά το δεύτερο στάδιο (προαγωγή ή promotion) της καρκινογένεσης συμβαίνει ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων-μυημένων (initiated) κυττάρων, μέσω επίδρασης παραγόντων που προάγουν την μίτωση και ονομάζονται προαγωγείς (Trosko J.E., Chang C.C. and Medkalf A, 1983). Το συγκεκριμένο στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι αντιστρεπτό, εάν αποσυρθεί ο μιτογόνο παραγοντας. Καθώς το μυημένο (initiated) κύτταρο διαιρείται, όταν πλησιάζει στην κυτταρική διαίρεση στην οποία φυσιολογικά θα πέθαινε και παρόλα αυτά προχωρά και σε επόμενη κυτταρική διαίρεση προστίθενται βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων- απογόνων, οι οποίες κανονικά δεν θα συνέβαιναν αν τα κύτταρα είχαν πεθάνει στην κατάλληλη χρονική στιγμή, στην οποία ήταν καθορισμένο να πεθάνουν. Από αυτά τα κύτταρα- απογόνους που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη, η οποία το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο (Κουρέτας Δ., 2003).
- Κατά το τρίτο στάδιο (προόδου ή progression), το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο, μετατρέπεται σε ένα καρκινικό και ανεξάρτητο του προαγωγέα, κύτταρο. Κατά πάσα πιθανότητα κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του προαγωγέα, κάποιο κύτταρο αρχίζει να εμφανίζει επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν έναν καρκινικό φαινότυπο (Hennings et al, 1983). Σύμφωνα με έρευνες φαίνεται ότι τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες είναι απαραίτητες για την

καρκινική εξαλλαγή και υπάρχουν αρκετές ενδείξεις, ότι η δεύτερη βλάβη αφορά απόλειψη αντιογκογονιδίων (Koufos et al, 1985).

#### 1.1.4. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η αιτία για το θάνατο 274.000 γυναικών κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο και είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου στις γυναίκες. Στην Ευρώπη 33.500 γυναίκες προσβάλλονται κάθε χρόνο, ενώ από αυτές οι 15.000 βρίσκουν το θάνατο.

Ο τράχηλος είναι το στενό τμήμα της μήτρας, που ενώνεται με την κορυφή του κόλπου. Στον τράχηλο συναντώνται δύο κύριοι τύποι κυττάρων, τα πλακώδη κύτταρα στον έξω-τράχηλο και τα αδενώδη κύτταρα στον ενδοτράχηλο. Το σημείο στο οποίο συναντώνται οι δύο διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι ονομάζεται ζώνη μετάπτωσης και αποτελεί το σημείο έναρξης των περισσότερων καρκίνων του τραχήλου. Οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από τα κύτταρα που καλύπτουν τον τράχηλο. Αυτά δεν μετατρέπονται απευθείας σε καρκινικά, αλλά προηγούνται σταδιακές προκαρκινικές αλλοιώσεις σε αυτά που τα μετατρέπουν σε καρκινικά.



**Εικόνα 1:** τράχηλος σε σχέση με το άνω μέρος του κόλπου και το οπίσθιο τμήμα της μήτρας

Τα πρώιμα στάδια του καρκίνου του τραχήλου ενδέχεται να είναι τελείως ασυμπτωματικά (Kumar Vet al, 2007). Κολπική αιμορραγία ή σπανιότερα ο σχηματισμός μίας κολπικής μάζας μπορεί να υποδεικνύουν την παρουσία κακοήθειας. Άλλα συμπτώματα του τραχήλου της μήτρας αποτελούν ο μέτριος πόνος κατά τη σεξουαλική επαφή και οι κολπικές εκκρίσεις. Σε προχωρημένο στάδιο είναι πιθανό να υπάρξουν μεταστάσεις στην κοιλιά και τους πνεύμονες. Τα συμπτώματα του

προχωρημένου καρκίνου του τραχήλου μπορεί να περιλαμβάνουν: απώλεια όρεξης, απώλεια βάρους, κόπωση, πυελικό πόνο, πόνο στην πλάτη, πόνος στο πόδι, πρησμένα πόδια, έντονη αιμορραγία από τον κόλπο και κατάγματα οστών (Nanda, Rita, 2006).

Ως κύριοι ενοχοποιητικοί παράγοντες της εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας θεωρούνται οι λοιμώξεις από τους ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το κάπνισμα, τη λοίμωξη από τον HIV, ενώ δεν είναι πλήρως γνωστά όλα τα αίτια του καρκίνου του τραχήλου αν και έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι παράγοντες (Gadducci A. et al, 2011).

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων είναι η αιτία του 70% του καρκίνου του τραχήλου παγκοσμίως (Medeiros L.R. et al, 2009). Οι γυναίκες που έχουν πολλούς σεξουαλικούς συντρόφους (ή που έχουν σεξουαλικές σχέσεις με άνδρες οι οποίοι είχαν πολλές συντρόφους διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο (American cancer society, 2006). Από τους 150-200 γνωστούς τύπους του ιού, 15 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 και 82) είναι αυτοί που έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλού κινδύνου, 3 (26, 53 και 66) αυτοί που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς υψηλού κινδύνου και 12 (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, και CP6108) αυτοί που χαρακτηρίζονται ως χαμηλού κινδύνου. Οι τύποι 16 και 18 είναι γενικά αποδεκτό ότι προκαλούν το 70% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Muñoz N et al, 2003).

Γενικότερα αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν οι γυναίκες που:

- ✚ έχουν αυξημένη σεξουαλική δραστηριότητα - είτε άρχισαν τις σχέσεις σε μικρή ηλικία, είτε έχουν πολλούς συντρόφους
- ✚ έχουν προσβληθεί από ορισμένες νόσους, όπως η μόλυνση από τον ιό του έρπητα τύπου II
- ✚ βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή μετά από μεταμόσχευση οργάνου
- ✚ και γυναίκες που η μητέρα τους πήρε το φάρμακο διαθυλοστιλβεστρόλη (DES) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Rubin M.M. et al, 2007, Hoover R.N. et al, 2011).

Η τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN), που αποτελεί τον πιθανό πρόδρομο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μπορεί συχνά να διαγνωστεί με το τεστ Παπανικολάου και να θεραπευθεί, ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη του καρκίνου. Οι καρκίνοι του τραχήλου και οι προ-καρκινικές αλλοιώσεις ταξινομούνται ανάλογα

με την μικροσκοπική τους εικόνα. Η ονομασία και η ιστολογική ταξινόμηση των προκαρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας έχει αλλάξει πολλές φορές κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Η ταξινόμηση της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας αποτελεί ένα περιγραφικό σύστημα, το οποίο ταξινομεί τις αλλοιώσεις ονομάζοντάς τις ως ήπιες, μέτριες ή σοβαρές δυσπλασίες ή καρκίνωμα in situ (CIS). Ο όρος τραχηλική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (CIN) αναπτύχθηκε, για να δώσει έμφαση στο φάσμα της ανωμαλίας σε αυτές τις αλλοιώσεις και να βοηθήσει την τυποποίηση της θεραπείας. Έτσι ταξινομείται ως ήπια δυσπλασία η CIN1, ως μέτρια δυσπλασία η CIN2 και ως σοβαρή δυσπλασία η CIN3. Προσφάτως η CIN1 και CIN2 έχουν συνδυαστεί σε CIN2/3 (De May, 2007).

Ιστολογικά υπάρχουν οι παρακάτω υπότυποι διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας:

- πλακώδες καρκίνωμα (περίπου 80-85%)
- αδenoκαρκίνωμα (περίπου το 15% στο Ηνωμένο Βασίλειο)
- ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
- μικροκυτταρικό καρκίνωμα
- νευροενδοκρινής όγκος
- υαλώδες καρκίνωμα

Παρόλο που οι καρκίνοι του τραχήλου προέρχονται από κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν προκαρκινικές αλλοιώσεις, εντούτοις μόνο μερικές γυναίκες που εμφανίζουν τέτοιες αλλοιώσεις θα αναπτύξουν καρκίνο. Η μετάβαση από την προκαρκινική κατάσταση στην καρκινική συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα προκαρκινικά κύτταρα εξαλείφονται χωρίς θεραπευτική αγωγή. Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις, ωστόσο τα προκαρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε αληθείς διηθητικούς καρκίνους. Επεμβαίνοντας στο αρχικό στάδιο είναι δυνατό να προλάβουμε σχεδόν όλους τους μετέπειτα αληθείς καρκίνους.

Η ανακάλυψη του τεστ Παπανικολάου για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχει οδηγήσει σε δραματική μείωση της θνησιμότητας από τον εν λόγω καρκίνο στις ανεπτυγμένες χώρες. Κάνοντας τακτικά το τεστ Παπανικολάου, η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου μπορεί να μειωθεί κατά 80%. μη φυσιολογικά αποτελέσματα μπορεί να υποδηλώνουν την παρουσία προκαρκινικών αλλοιώσεων, γεγονός που επιτρέπει την παραπέρα εξέταση και μτην πιθανή

προληπτική θεραπεία. Αν οι προκαρκινικές αλλοιώσεις ή ο καρκίνος του τραχήλου ανιχνευθούν νωρίς, η νόσος υπάρχει δυνατότητα να παρακολουθείται και να αντιμετωπιστεί με μικρή μείωση της γονιμότητας. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας συνίσταται από την ηλικία των 21 ετών, ενώ για το πόσο συχνά πρέπει να διενεργείται το τεστ κατευθυντήριες γραμμές δίνει ο αρμόδιος γιατρός.

Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμα στην αγορά δύο εμβόλια για τον HPV, ο οποίος θεωρείται η κύρια αιτία για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Τα δύο αυτά εμβόλια, το Gardasil και το Cervarix μειώνουν τον κίνδυνο των καρκινικών ή προκαρκινικών αλλοιώσεων στον τράχηλο και στο περίνεο κατά περίπου 93% (Medeiros L.R, et al, 2009). Το Gardasil, γνωστό και ως Silgard, δρα προληπτικά έναντι τεσσάρων υποτύπων (6,11,16 και 18) του HPV και η κυκλοφορία του εγκρίθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση στις 22/9/2006 (Waknine, Yael, 2006). Το Cervarix έχει προληπτική δράση έναντι δύο υποτύπων (16 και 18) του HPV και πήρε την έγκριση για να αρχίσει η κυκλοφορία του στην Ευρωπαϊκή Ένωση τον Σεπτέμβριο του 2007. Τα εμβόλια χορηγούνται σε κοπέλες ηλικίας 9-26 ετών και είναι ασφαλή και γενικά ανεκτά (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Ο εμβολιασμός των έφηβων γυναικών εμφανίζεται ως το πιο αποτελεσματικό μέσο για την προστασία έναντι των ασθενειών του τραχήλου και του καρκίνου (Beibei Lu et al., 2011).

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας έχει αργή ανάπτυξη και διακρίνεται σε πέντε στάδια:

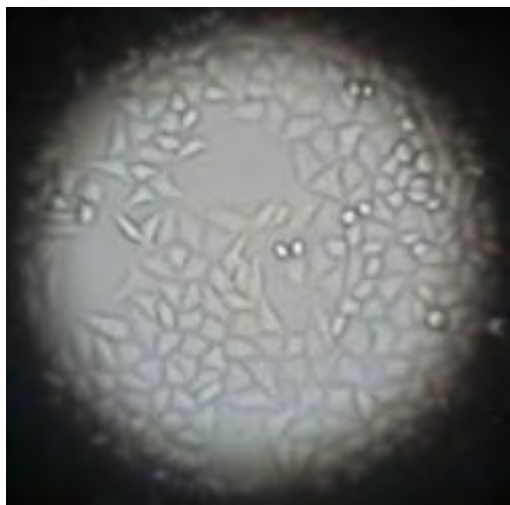
- ✚ Ενδοεπιθηλιακός καρκίνος in situ, δηλαδή μη διηθητικός καρκίνος
- ✚ Αρχόμενος καρκίνος
- ✚ Προχωρημένος καρκίνος
- ✚ Κατάσταση βαριά
- ✚ Κατάσταση μη αναστρέψιμη με μεταστάσεις

Η θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Έτσι, εάν είναι περιορισμένος στο επιθήλιο του τραχήλου, τότε το παθολογικό τμήμα του ιστού μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά ή να καταστραφεί με κρυοπηξία ή laser. Σε περίπτωση διηθητικού καρκίνου μπορεί να απαιτηθεί εγχείρηση για την αφαίρεση του προσβεβλημένου ιστού και των οργάνων και ακολούθως ακτινοθεραπεία για την εξουδετέρωση των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων.



Χρήσιμες είναι και οι βιολογικές θεραπείες (π.χ. χορήγηση ιντερφερόνης), ενώ στην περίπτωση όπου υπάρχουν μεταστάσεις ίσως να είναι απαραίτητη η χημειοθεραπεία.

Τα κύτταρα HeLa είναι η παλαιότερη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη κυτταρική σειρά (Rahbari R. et al, 2009). Πρόκειται για μια καρκινική σειρά κυττάρων του τραχήλου της μήτρας, η οποία προήλθε από την ασθενή Henrietta Lacks στις 8 Φεβρουαρίου το 1951 (Scherer W.F, Syverton JT, Gey G.O, 1953). Η Henrietta Lacks η οποία τελικά πέθανε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις 4 Οκτωβρίου το 1951 σε ηλικία 31 ετών, ήταν αφροαμερικανικής καταγωγής και εργαζόταν ως καπνεργάτρια. Ο γιατρός της George Otto Gey κράτησε δείγμα κυττάρων από τον καρκινικό της όγκο τα οποία καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο προκειμένου να δημιουργηθεί μία αθάνατη κυτταρική σειρά. Ήταν η πρώτη φορά που κύτταρα επιζούσαν εκτός του ανθρωπίνου σώματος. Τελικά έμελλε να αποτελέσουν ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία της βιοϊατρικής έρευνας με τη χρησιμοποίησή τους σε πολλούς ερευνητικούς τομείς και χιλιάδες ερευνητικές εργασίες (Grady, Denise, 2010).



*Εικόνα 2: HeLa κύτταρα από καλλιέργεια του εργαστηρίου όπως φαίνονται σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.*

## **1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ**

### **1.2.1. Γενικά**

Ο όρος χημειοπροφύλαξη εισήχθηκε για πρώτη φορά από τον Sporn. Χημειοπροφύλαξη ή χημειοπροστασία ορίζεται ως η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ουσιών, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε μέσω της διατροφής με τα φυσικά

συστατικά των τροφίμων. Σκοπός της χημειοπροφύλαξης είναι η ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου με τη χρήση ουσιών φυσικής ή συνθετικής προέλευσης (Sporn M.B, et al 1976). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χημειοπροφύλαξη διαφέρει από την πρόληψη μιας και η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή των συνηθειών (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος) του ατόμου. Από την άλλη η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση χαπιών ή συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία περιέχουν ενεργά συστατικά διατροφικών πηγών, όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά (Κωνσταντίνου Α., 2008). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν πως υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al 2004, Surch 2003).

Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001, Smith et al., 2005). Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών προσεγγίσεων: α) μείωση της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα, μέσω ελέγχου του εργασιακού περιβάλλοντος και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής β) εντοπισμός των πληθυσμιακών ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου εξαιτίας γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, έτσι ώστε να γίνονται σε αυτούς συχνές κλινικές εξετάσεις και γ) χημειοπροστασία με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Εκ των τριών παραπάνω προσεγγίσεων πολύ σημαντική θεωρείται η τελευταία, μιας και οι δύο πρώτες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων οι οποίοι οδηγούν σε καρκινογένεση (Shereiqi et al, 2000).

### **1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες διαχωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας στο οποίο δρουν. Γενικά οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχουν πλειοτροπική δράση, δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας ποικιλοτρόπως με τους καρκινογόνους παράγοντες. Οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η

βιοδιαθεσιμότητά τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κ.α. (De Flora & Ferguson, 2005, Kelloff, et al, 2005). Ο Wattenberg το 1985 έκανε την πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων στηριζόμενος στα αποτελέσματα in vivo δοκιμών σε πειραματόζωα. Στην πορεία των χρόνων ωστόσο πολλές μελέτες έχουν εμπλουτίσει την αρχική αυτήν ταξινόμηση.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες (Wattenberg L.W., 1985):

- A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- B. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.
- Γ. Παράγοντες παρεμπόδισης ή καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγή και την πρόοδο της καρκινογένεσης.

#### **A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου**

Εδώ περιλαμβάνονται παράγοντες οι οποίοι έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Γενικά αναστέλλουν τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι φυτικές πολυφαινόλες (φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ κ.α.), τα αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), διάφορα αμινοξέα και σουλφυδρυλικές ενώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) που ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981, Hartman & Shankel 1990, Κουρέτας 2003).

#### **B. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου**

Στους παράγοντες που παρεμποδίζουν την δράση του καρκινογόνου δρώντας στην πρώτη φάση της καρκινογένεσης περιλαμβάνονται οι:

- 1) Αναστολείς του κυτοχρώματος P450. Τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών ουσιών, όπου κυρίαρχο ρόλο έχουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μπορεί να μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του P450 θεωρείται ότι μπορεί να

παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.

2) Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών. Συνεπώς, ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης-GST) πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσιών.

3) Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών. Τα περισσότερα καρκινογόνα μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρονιόφιλες μορφές που αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων. Έτσι, η εξουδετέρωσή τους αποτελεί ένα βασικό μηχανισμό χημειοπροφυλακτικής δράσης.

4) Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA. Είναι ένζυμα ή φυσικές ουσίες που είτε άμεσα είτε έμμεσα εμπλέκονται στους μηχανισμούς αποκατάστασης βλαβών του DNA.

### **Γ. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.**

Στους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης κατά τους Morse και Stoner ανήκουν οι:

1) Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυαμινών, η οποία συχνά εμφανίζεται να είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Υπάρχουν παράγοντες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το μεταβολισμό των πολυαμινών.

2) Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η μη διαφοροποίησή τους. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη A, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang et al, 1986, Sani et al, 1990).

3) Ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα ενδιάμεσα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης με σκοπό την

ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της PKC, συμβάλλοντας έτσι στην καταστολή της καρκινογενετικής διαδικασίας (Kelloff G.J., et al, 1997).

4) Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων. Εδώ μπορεί να έχουμε μια πιο άμεση αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης, μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας ορμονών και αυξητικών παραγόντων που γίνεται επεμβαίνοντας στους υποδοχείς τους στην κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη. Σχετικό παράδειγμα είναι τα αντιοιστρογόνα (π.χ. ταμοξιφαίνη) που συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας έτσι την σύνδεση και προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan V.C., 1992).

5) Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων. Μεγάλο κομμάτι της έρευνας σχετικά με την ανασταλτική δράση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων έναντι των ογκογονιδίων έχει εστιαστεί στο ογκογονίδιο *ras*, η ενεργοποίηση του οποίου προϋποθέτει τη φαρνεσυλίωσή του. Η ουσία D-λιμονίνη που υπάρχει στα κίτρα, αναστέλλει την πρόοδο των όγκων του μαστού αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson et al, 1998).

6) Επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας. Οι χασμοσύνδεσμοι (gap junctions) είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων, μέσω των οποίων τα κύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά τους κύτταρα.. Αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στους όγκους. Ουσίες όπως το ρετινοϊκό οξύ και το β-καροτένιο που προάγουν την διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Zhang et al, 1991, Κουρέτας Δ., 2003).

7) Αποκατάσταση της ανοσολογικής απόκρισης. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση, μέσω διάφορων μηχανισμών. Σχετικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη Ε που σε κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων και το ρετινοϊκό οξύ που συμβάλλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων (natural killers) (Hill D.L., Grubbs C.J. 1992).

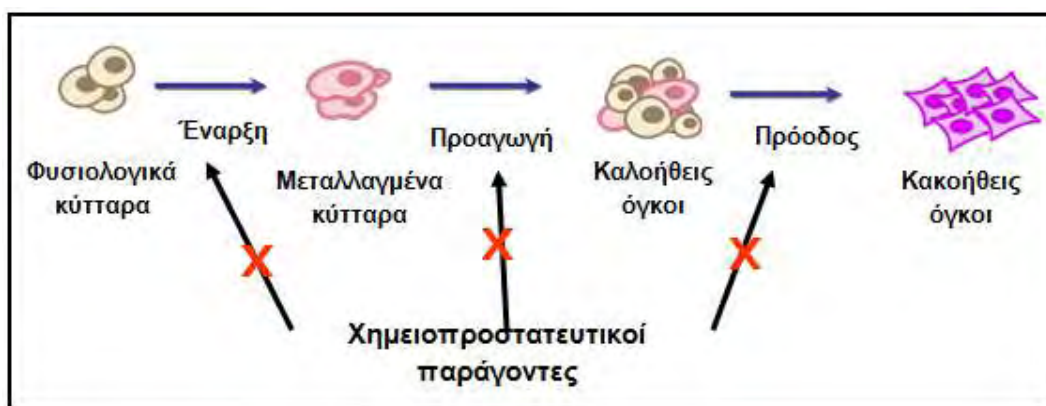
8) Επαγωγείς της απόπτωσης Η απόπτωση είναι μία διαδικασία απαραίτητη για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α., 1997). Διαταραχή αυτής της ομοιόστασης μπορεί να έχει σοβαρές παρενέργειες όπως η καρκινογένεση. Παράδειγμα επαγωγέα της απόπτωσης είναι το τριοξειδίο του αρσενικού που επάγει την απόπτωση στα

λευχαιμικά κύτταρα. Αυτό ενεργεί άμεσα επί της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου εξαλείφοντας το δυναμικό αυτής και οδηγώντας στην αναστολή της έκφρασης του Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3 (Zhu J. et al., 2002).

9) Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA. Η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν ως δότες μεθυλομάδων (Wainfain E, Poirier A, 1992).

10) Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και ένζυμα που συντελούν στη λύση της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται πρωτεάσες, όπως η κολλαγενάση και η υαλουρονιδάση καθώς και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών σε κάποιο ποσοστό οφείλεται στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης (Kennedy A.R., 1998).

11) Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ανάμεσα στα πολλά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την προαγωγική φάση της πειραματικά προκαλούμενης καρκινογένεσης, είναι και η αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, το οποίο συμμετέχει στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας Δ., 2003). Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών παράγονται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με μελέτες αναστολείς των κυκλοοξυγενασών (αντιφλεγμονώδη φάρμακα και φυτικές πολυφαινόλες) δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Reddy B.S et al, 1987). Επιπλέον, αναστολείς της λιποξυγενάσης (π.χ. βιταμίνη E) αναστέλλουν την φάση προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας στην επιδερμίδα ποντικών (Huang M.T. et al, 1991).



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης και της δράσης των χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

### 1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

#### 1.3.1. Γενικά

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ, 2010). Οι πολυφαινόλες παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών, ενώ αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου. Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί και αλλού λειτουργώντας ως άμυνα του εκάστοτε φυτού έναντι παθογόνων και του στρες που μπορεί να προκληθεί από την υπεριώδη ακτινοβολία και άλλους παράγοντες (Manach et al., 2004, Crozier et al., 2006). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν οι τροφές αυτές (Kris- Etherton P.M. et al, 2002). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al 2005).

### 1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Σχετικά με τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, μιας και ενώ άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες πάλι είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Οι πολυφαινόλες προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005). Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, στιλβένια και οι λιγνάνια).

#### 1.3.2.1. Φλαβονοειδή

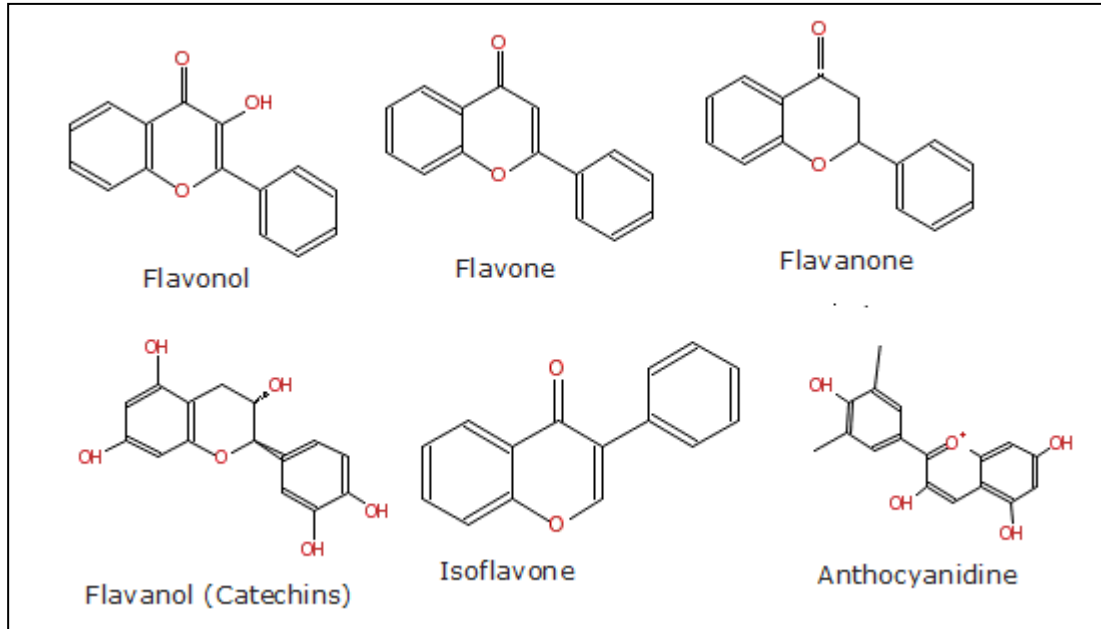
Τα φλαβονοειδή είναι η πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 4000 ενώσεις σε πολλές φυτικές πηγές. Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Επίσης δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Cheynier, 2005).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανίδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach et al., 2004).



- Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Συναντώνται στις περισσότερες τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο με σημαντικότερες πηγές τους να είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι. Συνήθως βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως O – γλυκοσίδια και συσσωρεύονται κυρίως στην επιδερμίδα και στα φύλλα του φυτού εφόσον η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al., 2004).
- Φλαβανόλες: συνιστούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών, Υπάρχουν είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, έπειτα από κατεργασία με ισχυρά οξέα. (Crozier A, et al. 2006). Οι φλαβανόλες εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, ενώ σημαντικότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.
- Φλαβόνες: Οι κυριότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στα φρούτα και στα λαχανικά είναι γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης. Οι περισσότερες υπάρχουν ως 7 - O – γλυκοσίδια. Βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά και στα εσπεριδοειδή (σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi F, Naczk M. 1995).
- Φλαβανόνες: βρίσκονται στις ντομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N., 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες (Manach C. et al, 2004).
- Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτο-οιστρογόνου και την ικανότητα τους να μπορούν να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Συναντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης (Manach C. et al, 2004).
- Ανθοκυανιδίνες: Οι ανθοκυανιδίνες εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων τους και προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Μέσα στο φυτό είναι πολύ ανθεκτικές στο φως, το pH και σε

καταστάσεις οξείδωσης. Η κυανιδίνη είναι η κύρια εκπρόσωπος τους. Συναντώνται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαίτερος στα φρούτα (Clifford M.N., 2000).



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

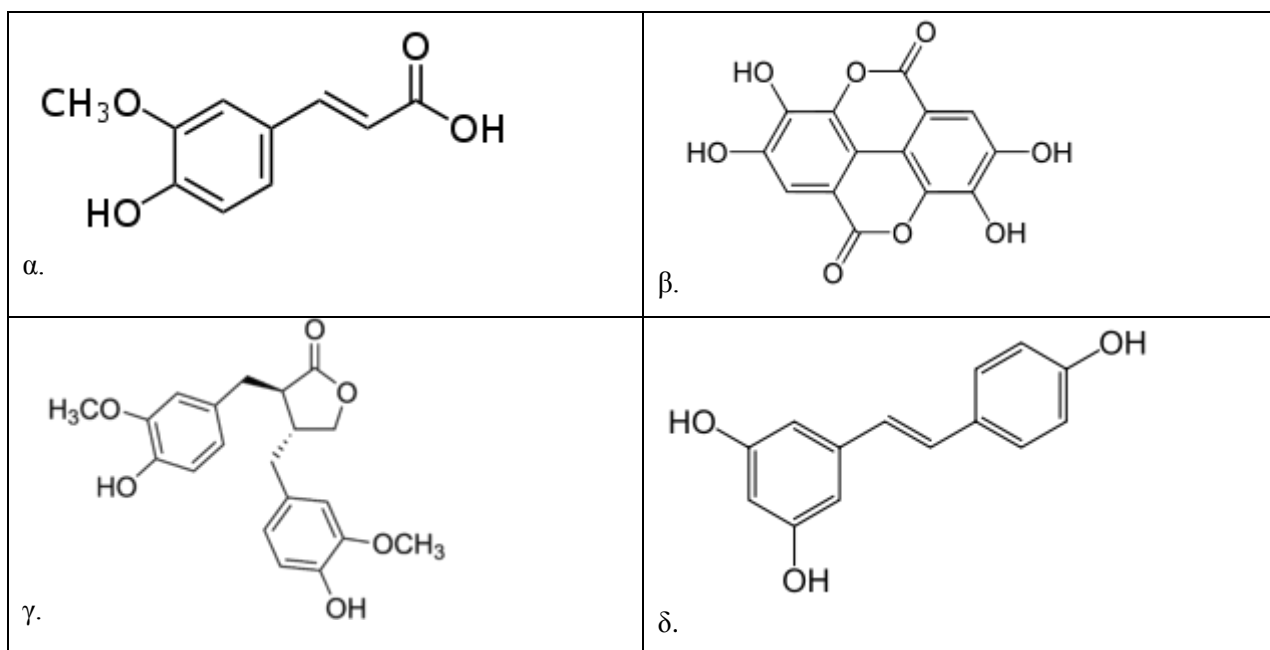
### 1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα χωρίσουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- ❖ Φαινολικά οξέα: Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκιναμικά (C6-C3) οξέα. Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξάιρεση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες τανίνες (Clifford M.N., Scalbert A, 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά σε σύγκριση με τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως

γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006, Manach et al., 2004).

- ❖ Λιγνάνια: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένα με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Τα κύρια φυτικά λιγνάνια είναι η σεκο-ισο-καΐλαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, τα οποία μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε δημητριακά, φρούτα, λαχανικά και δημητριακά (Adlercreutz H., Mazur W., 1997).
- ❖ Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινόλων που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί (Bertelli A. et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση.



**Εικόνα 5:** α) χημική δομή φερουλικού οξέος (ανήκει στα υδροξυκιναμικά οξέα), β) ελλαγικό οξύ (ανήκει στα υδροξυβενζοϊκά οξέα), γ) ματαιρεσινόλη (λιγνάνιο) και δ) ρεσβερατρόλη (στιλβένιο)

### 1.3.3. Βιολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Γενικά οι πολυφαινόλες:

- ✓ Θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Ακόμη, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων (Manach C., et al, 2004, Di Carlo G., et al., 1999, Harborne J.B. 1986).
- ✓ Ως αντιοξειδωτικά οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al, 2005).

- ✓ Η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινόλων, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M. & Dong Z, 2006).
- ✓ Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης και την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν τον ρόλο των πολυφαινόλων στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert A. et al, 2005).

## **1.4.ΧΕΙΛΑΝΘΗ**

### **1.4.1. Η οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae)**

Η οικογένεια των χειλανθών περιλαμβάνει περίπου 236 γένη και 6900 με 7200 είδη παγκοσμίως. Η γεωγραφική κατανομή τους είναι κυρίως στη ζώνη της Μεσογείου, αλλά κάποιες ομάδες τις συναντάμε στην Αυστραλία, στη νοτιοδυτική Ασία καθώς και στη νότιο Αμερική (Raymond M. Harley et al, 2004). Η οικογένεια των χειλανθών περιλαμβάνει πολλά γνωστά φυτά με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Σε αυτήν ανήκουν κυρίως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, βότανα και θάμνοι σημαντικότερα των οποίων είναι το φασκόμηλο (*Salvia*), το θυμάρι (*Thymus*), η μέντα (*Mentha*), η ρίγανη (*Origanum*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus*), η λεβάντα (*Lavandula*), ο βασιλικός (*Ocimum*) και το τσάι του βουνού (*Sideritis*) (Kokkini S. et al, 2004). Τα δέντρα συναντώνται σπανιότερα στην οικογένεια των χειλανθών

Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας είναι αρωματικά και εκκρίνουν αιθέρια έλαια από τους αδένες των φύλλων και των βλαστών τους με πολλές ωφέλιμες χρήσεις για τον άνθρωπο (Gali-Muhtasib, 2006). Το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια ποικίλλει σημαντικά, τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά ανάλογα με το είδος, την εποχή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται το φυτό καθώς και ανάλογα με τις γενετικές παραλλαγές που παρατηρούνται κατά αντιστοιχία με τη γεωγραφική προέλευσή του φυτού. Ο χρόνος

συγκομιδής θεωρείται επίσης σημαντικός τόσο όσον αφορά το συνολικό περιεχόμενο του φυτού σε αιθέρια έλαια όσο και στην αναλογία των βιοδραστικών στοιχείων (Ozen et al., 2004, Formisano et al., 2007, Raal et al., 2007, Sefidkon et al., 2007). Σχετικό παράδειγμα αποτελεί το φασκόμηλο που περιέχει διπλάσια ποσότητα σε αιθέρια έλαια κατά το τέλος του καλοκαιριού σε σύγκριση με την αρχή της άνοιξης, ενώ επίσης παρουσιάζει διαφορά και στο ποσό των φαινολικών του συστατικών (Kokkini S. et al, 2004). Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας είναι ευρέως καλλιεργούμενα όχι μόνο για τις αρωματικές τους ιδιότητες αλλά και για την ευκολία που παρουσιάζει η καλλιέργειά τους, μιας και μπορούν να διαγωνιστούν με μοσχεύματα βλαστού. Ακόμη καλλιεργούνται για τα εδώδιμα φύλλα τους, άλλα καλλιεργούνται για καλλωπιστικούς σκοπούς, ενώ άλλα για χρήση στη μαγειρική ως μυρωδικά, όπως η ρίγανη. Τέλος φυτά της οικογένειας των χειλανθών παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις όπως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αγγολυτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές, συμβάλλοντας έτσι στη θεραπεία ποικίλων ασθενειών (Ryu et al, 1997, Delamare et al., 2006, Loizzo et al., 2007, Loizzo et al., 2008).

#### **1.4.2. Φασκόμηλο (*Salvia spp.*)**

##### **1.4.2.1. Βοτανικά στοιχεία**

Το φασκόμηλο ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae), στην τάξη των Λαμιωδών (Lamiales) στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων. Είναι δικότυλοι, πολυετείς, αειθαλείς θάμνοι. Έχουν γκριζοπράσινα μαλακά φύλλα και μωβ-μπλε λουλούδια στα άνθη κατά το καλοκαίρι. Το φασκόμηλο ευδοκμεί σε ηλιόλουστες περιοχές με αλκαλικά εδάφη και φτάνει το 1-1.5 μέτρο σε ύψος. Το φασκόμηλο αποτελεί το μεγαλύτερο γένος των χειλανθών με 900 είδη από θάμνους, πόες και μονοετή φυτά (Sutton John 2004, Clebsch Betsy, Carol D. Barner 2003). Τα πιο γνωστά είδη είναι τα *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia sclarea*, *Salvia viridis*, *Salvia horminoides*, *Salvia divinorum*, *Salvia rutilans* και *Salvia pomifera*. Στην Ελλάδα συναντούμε 23 είδη φασκόμηλου με κοινές ονομασίες όπως ελελίφασκος, αλιφασκιά, φασκομηλιά, μηλοσφακιά, και αγριοφασκιά (Davis P., 1982).

Τα σημαντικότερα είδη είναι:

- ❖ **Salvia officinalis**: καλλιεργείται στην πρώην Γιουγκοσλαβία, στην Αλβανία, στην Τουρκία, στην Ιταλία, στην Ελλάδα, στις Η.Π.Α, στην Ισπανία και στην Κρήτη (Skoula et.al, 2000). Στη χώρα μας παρουσιάζει περιορισμένη εξάπλωση ως αυτοφυές φυτό, καθώς συναντάται μόνο στην περιοχή της Ηπείρου.
- ❖ **Salvia fruticosa**: είναι γνωστό και ως αλιφασκιά (Greek sage) είναι ενδημικό των μεσογειακών και μεσανατολικών χωρών και αποτελεί το πιο κοινό είδος του γένους *Salvia* στην Ελλάδα. Φύεται σε περιοχές χαμηλών υψομέτρων (κάτω των 300 m), εκτός από την Κρήτη, όπου φύεται μέχρι και στα 1000 – 1200 m.
- ❖ **Salvia pomifera** (πικρή φασκομηλιά Cretan sage): είναι ενδημικό της Ν. Ελλάδας και των παραλίων της Μ. Ασίας. Ευδοκίμει σε υψόμετρο μέχρι και 500 m.
- ❖ **Salvia Sclarea** (Clary sage): στην Ελλάδα, απαντάται ως αυτοφυές στην Ήπειρο και στη Μακεδονία σε υψόμετρο 300-900 m, ενώ κυριότερα κέντρα παραγωγής είναι η Γαλλία, η πρώην Σοβιετική Ένωση και η Ουγγαρία. Η ονομασία του προέρχεται από τη λατινική λέξη *sclarea* (καθαρός-φωτεινός) και σχετίζεται με την παραδοσιακή χρήση του φυτού για τον καθαρισμό των ματιών (Simon J.E., 1984, Λάζαρη Δ., 2005).
- ❖ **Salvia Argentea** (silver sage): είναι ενδημικό της νότιας Ευρώπης από την Πορτογαλία ως τη Βουλγαρία. Κατά τον πρώτο χρόνο της ανάπτυξης του σχηματίζονται τα χαρακτηριστικά μεγάλα αργυρά του φύλλα από τα οποία έχει πάρει και το όνομά του (*argentum* = ασημί στα Λατινικά) και κατά το δεύτερο χρόνο σχηματίζεται ο ανθοφόρος βλαστός του (Clebsch, Betsy, Carol D. Barner, 2003).



**Εικόνα 6:** α) *Salvia officinalis*, β) *Salvia fruticosa*, γ) *Salvia pomifera* δ) *Salvia Sclarea* και ε) *Salvia Argentea*

#### 1.4.2.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Τα φυτά του γένους *Salvia* (φασκόμηλο) έχουν χρησιμοποιηθεί για τις ευεργετικές ιδιότητές τους επί χιλιετίες. Η λέξη *Salvia* προέρχεται από το λατινικό “*salvare*” που σημαίνει σώζω. Κατά το μεσαίωνα, χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον για προβλήματα υγείας. Μάλιστα λέγεται ότι ο Καρλομάγνος είχε διατάξει να φυτεύεται σε λαχανόκηπους και σε κήπους μοναστηριών. Ακόμη, σε περιπτώσεις επιδημιών, όπως αυτές της χολέρας, πίστευαν ότι όποιος έχει στο σπίτι του φυτεμένη φασκομηλιά δεν πρόκειται να βρει το θάνατο (Ζαννέτου-Παντελή 2000).

Διάφορα είδη από το γένος *Salvia* έχουν χρησιμοποιηθεί στην λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία πληγών και την ανακούφιση του στομάχου και του ήπατος, καθώς και για την αντιμετώπιση ρευματισμών και του κοινού κρυολογήματος με τη μορφή έγχυσης και αφεψήματος σε διάφορα μέρη του κόσμου (Bayrak A., Akgul A. 1987, Sezik E., Yesilada E., 1999). Μερικά από τα φαινολικά συστατικά των φυτών που ανήκουν σε αυτό το γένος έχουν δείξει επίσης άριστη αντιμικροβιακή δράση, αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και αντιοξειδωτική δράση (Hohmann et.al, 1999, Masaki et.al., 1995, Pizzale et.al., 2002). Οι γλοιώδεις σπόροι τους χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη μείωση της φλεγμονής των



οφθαλμών, ενώ έχει γίνει αναφορά και για αντισπασμωδικές, αιμοστατικές και αντικαρκινικές ιδιότητές τους (Simon J.E. et al., 1984). Τέλος, εκχυλίσματα και διάφορα αιθέρια έλαιά τους χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς και στην αρωματοποιία.

Όλες οι παραπάνω ιδιότητες του φασκόμηλου οφείλονται στις βιοδραστικές ουσίες, τις οποίες περιέχει και κυρίως στις πολυφαινολικές ενώσεις και τα τερπένια. Για παράδειγμα η αντιοξειδωτική δράση του οφείλεται στα τερπενοειδή και τα φαινολικά οξέα, όπως είναι τα ενεργά ολιγομερή του καφεϊκού οξέος (σαλβιανολικά οξέα) (Yinrong Lu & L. Year Foo, 1999). Η αντιφλεγμονώδης δράση του οφείλεται στα τριτερπένια (ολεανολικό και ουρσολικό) και το διτερπένιο καρνοσολικό οξύ. Η αντιμικροβιακή δράση του αποδόθηκε στην παρουσία 1,8 κινεόλης και α και β-πινενίου (Miura et al., 2000).

#### - Πολυφαινολικές ενώσεις

Τα διάφορα είδη του φασκόμηλου περιέχουν πληθώρα πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 160 μερικές από τις οποίες είναι μοναδικές στο γένος. Μεγάλος αριθμός των ουσιών αυτών προέρχονται από ποικίλες χημικές μετατροπές του καφεϊκού οξέος.

#### - Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στο γένος *Salvia* και κυρίως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοσίδες αυτών.

#### - Φαινολικά οξέα

Λόγω του μεγάλου αριθμού των φαινολικών οξέων, τα οποία έχουν ανιχνευθεί στα διάφορα είδη του γένους *Salvia* ενδεικτικά αναφέρονται τα ακόλουθα: καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, cis-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, trans-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, σαλβιανολικό οξύ I, σαλβιανολικό οξύ K, σαζεκουμαρίνη, φερουλικό οξύ (Κουλάδη Μ., 2005).

### 1.4.3. Μέντα (*Mentha spp.*)

#### 1.4.3.1. Βοτανικά στοιχεία

Η μέντα ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae), στην τάξη των Λαμιωδών (Lamiales), στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων. Το όνομά της προέρχεται από το λατινικό *menthe* που προέρχεται από το αρχαιοελληνικό Μίνθη. Στην ελληνική μυθολογία η Μίνθη ήταν μία νύμφη, η οποία μεταμορφώθηκε σε φυτό μέντας (Quattrocchi, Umberto, 1999).

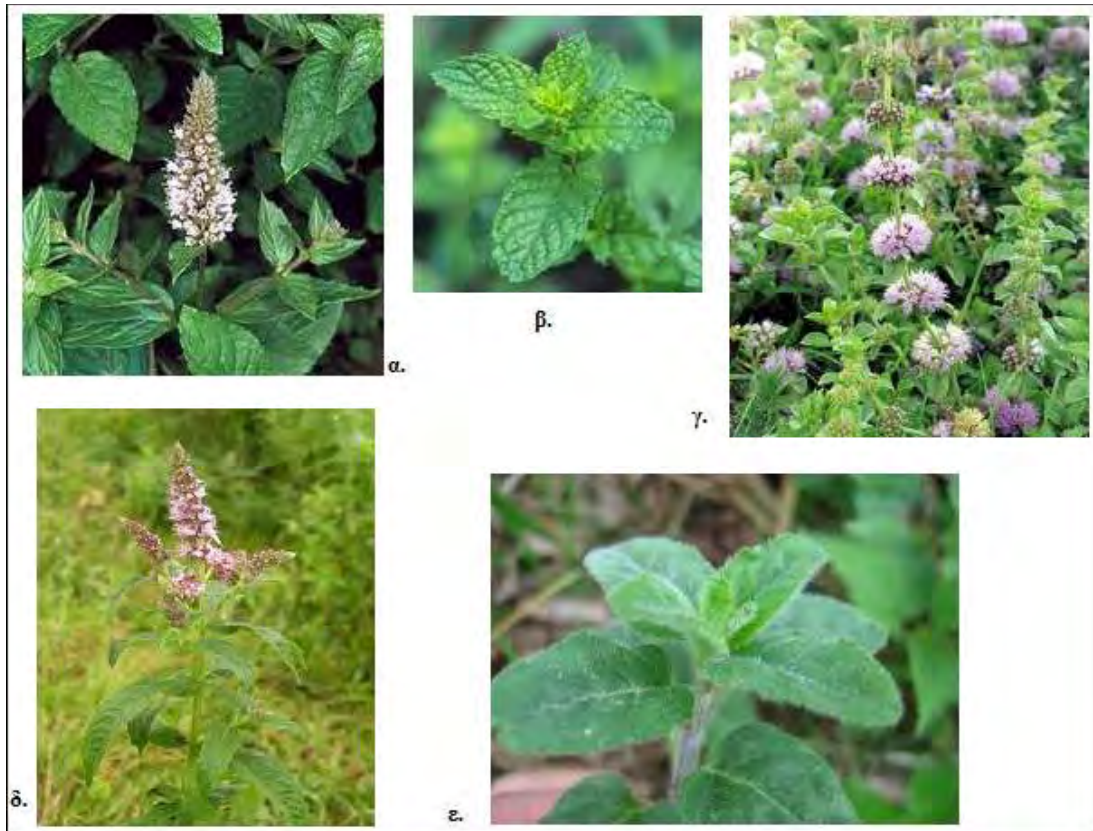
Το γένος της μέντας εμφανίζεται στην Ευρώπη, την Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία και τη Β. Αμερική (Brickell C. et al, 1997). Ο αριθμός των ειδών της μέντας δεν είναι απόλυτα σαφής και υπολογίζονται γύρω στα 25 (Gulluce M. et al, 2007). Τα φυτά αυτά ευδοκιμούν στα θερμά και ξηρά κλίματα και φέρουν αδενώδεις τρίχες στα φύλλα και στους βλαστούς. Οι τρίχες αυτές εκκρίνουν αιθέρια έλαια σε όλα τα είδη του γένους *Mentha*, άγρια και καλλιεργούμενα. Το κύριο αιθέριο έλαιο στο οποίο οφείλεται το έντονο και χαρακτηριστικό άρωμα που αναδίδουν είναι η μινθόλη (menthol), που είναι ένα τερπενοειδές (Kokkini, 2004).

Τα χρώματα των φύλλων των φυτών, τα οποία ανήκουν στο συγκεκριμένο γένος ποικίλλουν από σκούρα πράσινα και γκριζοπράσινα σε μωβ, μπλε και μερικές φορές ανοικτό κίτρινο. Τα λουλούδια είναι λευκά-μωβ που παράγονται σε ψευδοσπονδυλώματα και οι καρποί είναι μικρές ξηρές κάψες που περιέχουν τέσσερα σπέρματα (Brickell C. et al, 1997).

Στην Ελλάδα, λόγω της μεγάλης γεωκλιματικής ποικιλομορφίας απαντάται σε όλη την έκταση της χώρας. Τα κυριότερα είδη μέντας που συναντώνται στον Ελλαδικό χώρο είναι:

- ❖ ***Mentha piperita***: Είναι φυτό πολυετές, ύψους μέχρι 80 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι ωοειδή - στρογγυλά, επιφυή, τεφρόασπρα, χνουδωτά στην κάτω επιφάνεια. Τα άνθη του είναι σε ακραία στάχια, χρώματος άσπρου ή ρόδινου. Είναι αυτοφυές σε υγρά μέρη και στις όχθες ποταμών και ρυακιών. Συλλέγεται το υπέργειο τμήμα του φυτού, όταν αυτό βρίσκεται σε πλήρη άνθηση. Από τα φύλλα και από τα άνθη παίρνουμε το λάδι που περιέχει μινθόλη.

- ❖ **Mentha viridis** (πράσινη μέντα): κοινώς ο δυόσμος ή βάλσαμο, ονομάζεται και ρωμαϊκή μέντα. Ευδοκίμει σε υγρά εδάφη.
  
- ❖ **Mentha pulegium** (μέντα η πουλέγιος): κοινώς φλισκούνι ή φλεσκούνι. Είναι φυτό πολυετές, ύψους μέχρι 20 εκατοστά. Τα φύλλα του είναι μικρά, ωοειδή ή επιμήκη, με μικρό μίσχο. Τα άνθη βρίσκονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους, χρώματος ρόδινου ή συνηθέστερα ιώδους. Η άνθηση αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί μέχρι και τον Οκτώβριο. Το αιθέριο έλαιο της έχει ως κύριο συστατικό του μια κετόνη, την πουλεγόνη από την οποία και πήρε την ονομασία του.
  
- ❖ **Mentha longifolia** (κοινώς αγριοδυόσμος): Αναπτύσσεται σε κοίτες ρυακιών και γενικά σε υγρούς τόπους. Ανθίζει στα μέσα προς τέλη του καλοκαιριού και δίνει άνθη με ροζ, μωβ ή λευκό χρώμα (Blamey, M. & Grey-Wilson, C.,1989).
  
- ❖ **Mentha aquatica**: είναι ένα πολυετές φυτό, ενδημικό στην Ευρώπη και την Ασία. Όπως υποδηλώνει το όνομα του, αναπτύσσεται κατά μήκος των όχθων ρυακιών, ποταμών, λιμνών, φραγμάτων, καναλιών, και υγρών λιβαδιών έως σε υψόμετρο έως και 1200 μέτρα (Maria Luisa Sotti, 1989).



**Εικόνα 7:** α) *Mentha piperita*, β) *Mentha viridis*, γ) *Mentha pulegium* δ) *Mentha longifolia* και ε) *Mentha aquatica*

#### 1.4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Τα διάφορα είδη του γένους *mentha* έχουν από παλιά βρει εφαρμογή τόσο στην παραδοσιακή όσο και στη συμβατική ιατρική. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στα μονοτερπένια, τα οποία βρίσκονται στα αιθέρια έλαιά τους, καθώς και στις διάφορες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες σε συνδυασμό με τα μονοτερπένια τους προσδίδουν ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες.

Τα αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακή, αντιαυτική και αντισπασμωδική δράση, ενώ παράλληλα διαλύουν και τα αέρια του στομάχου. Τελευταία, διάφορα αιθέρια έλαια έχουν χαρακτηριστεί και ως φυσικά αντιοξειδωτικά ενώ ερευνάται και πιθανή αντικαρκινική τους δράση. Η μινθόλη θεωρείται το πιο σημαντικό συστατικό της μέντας και χρησιμοποιείται τόσο για φαρμακευτικούς, όσο και για διατροφικούς σκοπούς. Επιπλέον, εμφανίζει αντιμικροβιακή, τονωτική, αντισπασμωδική, αναλγητική, καρδιοτονωτική, αντιβηχική και αντιασθματική δράση, ηρεμεί το στομάχι και δρα κατά των ιλίγγων, της ταχυκαρδίας και των νευρικών διαταραχών (Zheng W, Wang S.Y., 2001).

Η πιο σημαντική κατηγορία πολυφαινολών στα διάφορα είδη μέντας είναι τα φλαβονοειδή. Τα διάφορα είδη χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκεκριμένων λιπόφιλων φλαβονοειδών. Οι φαινολικές ενώσεις της μέντας διαπιστώθηκε ότι έχουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικής δράσης: αντιοξειδωτική, κυτταροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, εναντίον του έλκους, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητική, χημειοπροστατευτική κ.α.

Ωστόσο, εκτός από θεραπευτικές ιδιότητες, ορισμένα είδη μέντας μπορεί να εμφανίζουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (Mimica-dukic N. et al., 2008). Για παράδειγμα το είδος *Mentha pulegium* περιέχει πουλεγόνη, η οποία όταν βρίσκεται σε μεγάλα ποσά σε σχέση με τα άλλα συστατικά, δρα τοξικά και μπορεί να προκαλέσει μέχρι και το θάνατο, μιας και παλιότερα χρησιμοποιούνταν σαν εκτριωτικό.

#### **1.4.4. Τσάι του βουνού (*Sideritis spp*)**

##### **1.4.4.1. Βοτανικά στοιχεία**

Τα φυτά του γένους *Sideritis* είναι μέλη της οικογένειας των Χειλανθών (*Labiatae* ή *Lamiaceae*) και είναι δικοτυλήδονα. Στην Ελλάδα τα φυτά του συγκεκριμένου γένους είναι γνωστά σαν τσάι του βουνού. Το τσάι του βουνού ανήκει στα αυτοφυή είδη και αναφορές της ύπαρξής του υπάρχουν ακόμη από την αρχαιότητα από το Θεόφραστο (372-287 π.Χ.) και το Διοσκουρίδη (10 αι. μ.Χ.). Το όνομα *Sideritis*, το οποίο χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο γένος, προέρχεται από την ελληνική λέξη σίδηρος, καθώς σύμφωνα με μία εκδοχή οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν τα φυτά του συγκεκριμένου είδους προκειμένου να γιατρέψουν τις πληγές των πολεμιστών, οι οποίες προέρχονταν από όπλα, τα οποία ήταν φταγμένα από αυτό το μέταλλο. Σύμφωνα με μία άλλη πάλι εκδοχή στο γένος αυτό αποδόθηκε το συγκεκριμένο όνομα, επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού τα ροφήματα που παρασκευάζονται έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο (González-Burgos E. et al, 2011)

Είναι πολυετής ή μονοετής πόα και ο βλαστός τους είναι απλός ή διακλαδισμένος σε δευτερεύοντες. Τα φύλλα του έχουν σχήμα λόγχης και συνήθως είναι οδοντωτά. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, έχουν χρώμα λευκό ή συνηθέστερα κίτρινο και αναπτύσσονται σε ταξιανθία σταχίου (Γκολιάρης Α., 1987). Τα φυτά του γένους *Sideritis* συναντώνται σε αφθονία σε μεσογειακές περιοχές, στα Βαλκάνια, στην Ιβηρική χερσόνησο και στη Μακρονησία, ενώ ακόμη μπορούμε να τα συναντήσουμε στην κεντρική Ευρώπη και σε ορισμένα εύκρατα μέρη της Ασίας. Ευδοκιμεί σε μεγάλα υψόμετρα ακόμη και πάνω από 1000 μέτρα σε λίγο ή καθόλου χώμα, γι' αυτό και συναντάται συχνά σε επιφάνειες βράχων.

Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει περίπου 140 γνωστά είδη και υποείδη, τα οποία εμφανίζονται κυρίως στις παραμεσόγειες χώρες (Willis, 1966, Tutin et al., 1972, Strid & Tan, 1991). Το τσάι του βουνού είναι πολύ δημοφιλές στην Ελλάδα, την Αλβανία και τη Βουλγαρία, όπου χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή ροφημάτων αλλά και για τις αρωματικές του ιδιότητες στις τοπικές κουζίνες.

Τα ενδημικά είδη της Ελλάδας είναι:

- *Salvia purpurea* - Δ. Ελλάδα, Ιόνια νησιά και Κρήτη
- *Sideritis athoa* – Άγιο Όρος (όρος Άθως), Πίνδος, Θράκη- κοινή ονομασία τσάι βλάχικο
- *Sideritis scardica* -Όλυμπος, κοινή ονομασία Τσάι του Ολύμπου
- *Sideritis raeseri* -Παρνασσός, κοινή ονομασία Τσάι του Παρνασσού ή τσάι του βελουχιού
- *Salvia theezans* Boiss & Heldr – Πελοπόννησος
- *Sideritis clandestina* -Ταύγετος, κοινή ονομασία τσάι του Μαλεβού ή τσάι Ταύγετου  
*Sideritis Euboea* – Εύβοια, κοινή ονομασία τσάι της Δίρφους
- *Sideritis syriaca* – Κρήτη, κοινή ονομασία τσάι της Κρήτης γνωστό και ως Μαλοτήρα (Papanicolaou et al., 1982).



**Εικόνα 8:** α) *Sideritis raeseri*, β) *Sideritis syriaca* (μαλοστήρα), γ) *Sideritis athoa* και δ) *Sideritis euboica*

#### 1.4.4.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Τα εκχυλίσματα και τα περισσότερα αιθέρια έλαια του γένους *Sideritis* είναι βιοδραστικά, κυρίως λόγω της περιεκτικότητας τους σε φλαβονοειδή και τερπενοειδή (Paranicolaou et al. 1984, Samaras et al. 2002). Τα φυτά αυτού του γένους έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για τη διευκόλυνση της διαδικασίας της πέψης, την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και για την καταστολή του κοινού κρυολογήματος, του ιού της γρίπης και άλλων ιών. Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή στην ανακούφιση από αλλεργίες, δύσπνοια, ρινική συμφόρηση, ήπιο άγχος και πόνο (Menghini et al., 2005).

Επιστήμονες έχουν προτείνει πως ίσως η χρήση των φυτών του συγκεκριμένου γένους ως πανάκεια, δεν απέχει τελικά και πολύ από την πραγματικότητα. Πρόσφατες δοκιμές έχουν δείξει ότι το τσάι του βουνού βοηθάει στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, ενώ οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες βοηθάνε στην πρόληψη του καρκίνου δρώντας χημειοπροστατευτικά. Ο *Sideritis* είναι επίσης γνωστό ότι έχει αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Tadic V.M., 2012). Τέλος, σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια το τσάι του βουνού βοήθησε στο να αντιστραφεί ο σχηματισμός των εγκεφαλικών πλακών,

γεγονός που προσφέρει μία ελπίδα για τη θεραπεία του Alzheimer (Deutsche W, 2012).

Η βιβλιογραφία δείχνει ότι η γεωγραφική προέλευση, η σύνθεση του εδάφους, οι διαφορές στη σύνθεση των διαφόρων φύλλων, η ώρα της συγκομιδής, η μετασυλλεκτική αποθήκευση και διαχείριση, και η φυσική δομή των διάφορων ειδών πιθανόν να επηρεάζουν τη σύνθεση και επομένως και τα ποσά των πολυφαινολών των φύλλων του τσαγιού. Επίσης, σε αυτήν τη μεταβλητότητα συμβάλλει και η ευαισθησία των ενώσεων του τσαγιού κατά εκχύλιση από διαφορετικούς διαλύτες (Lin et al., 2003, Astill R. et al., 2001, Wang et al., 2000).

## **1.5.ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα γένη των φυτών *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HeLa χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 18. Τα υπό μελέτη εκχυλίσματα ήταν τόσο υδατικής, όσο και μεθανολικής σύστασης.

# **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

## **2.1. ΥΛΙΚΑ**

### **2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια**

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).



### 2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

- i. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:
  - ✓ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gilbo BRL 41966)
  - ✓ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
  - ✓ Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
  - ✓ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υλικά:

α) Θρεπτικό υλικό με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25mlFBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

ii. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)

iii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)

iv. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

v. Μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα φυτών από τα γένη *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis*

### 2.1.3. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα, που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από αρωματικά φυτά από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis*. Τα εκχυλίσματα ήταν δύο τύπων: υδατικά και μεθανολικά. Τα είδη των προαναφερθέντων φυτών που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω (Πίνακες 1):

Είδος φυτού	Τύπος εκχυλίσματος	TPC (mg GAE/gr ξηρού βάρους)
<i>Salvia officinalis</i>	Υδατικό	91
<i>Salvia officinalis</i>	Μεθανολικό	184
<i>Salvia pomifera pomifera</i>	Υδατικό	311
<i>Salvia pomifera pomifera</i>	Μεθανολικό	287
<i>Salvia pomifera calveina</i>	Υδατικό	-
<i>Salvia pomifera calveina</i>	Μεθανολικό	-
<i>Salvia fruticosa</i>	Υδατικό	190
<i>Salvia argentea</i>	Υδατικό	205
<i>Salvia sclarea</i>	Υδατικό	169
<i>Salvia sclarea</i>	Μεθανολικό	242
<i>Mentha pulegium pulegium</i>	Υδατικό	188
<i>Mentha longifolia</i>	Υδατικό	216
<i>Sideritis raeseri raeseri</i>	Υδατικό	273
<i>Sideritis raeseri raeseri</i>	Μεθανολικό	430
<i>Sideritis clandestina peloponnesiaca</i>	Υδατικό	-
<i>Sideritis clandestina peloponnesiaca</i>	Μεθανολικό	-
<i>Sideritis scardica</i>	Υδατικό	-
<i>Sideritis clandestina clandestina</i>	Υδατικό	-

**Πίνακας 1.** Εκχυλίσματα από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* και το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (TPC).

## 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

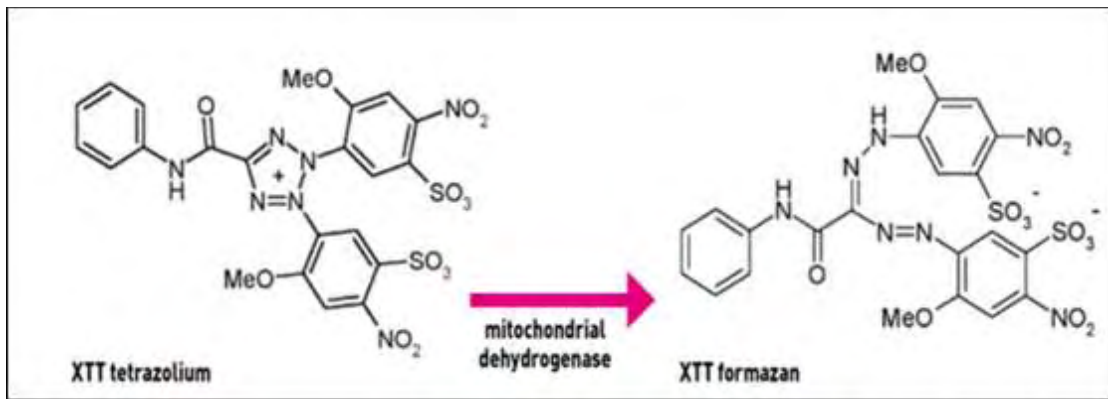
### 2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO<sub>2</sub> 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 330μl τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 4 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5ml) με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

### 2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

#### 2.2.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* στην καρκινική κυτταρική σειρά HeLa χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



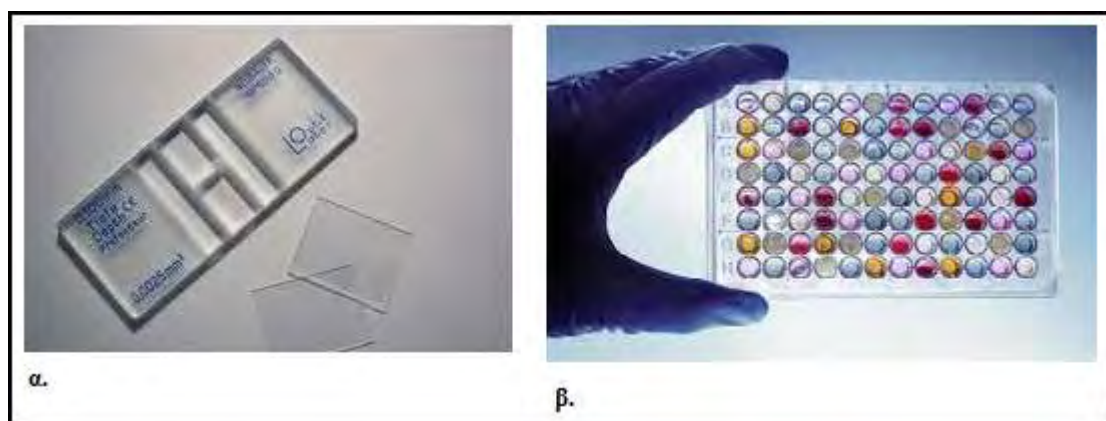
**Εικόνα 9 :** μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.

### 2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθονταν 5000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστίθονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37<sup>0</sup>C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες) συνολικού όγκου 100 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθονταν 50 μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Σημειώνεται ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του κάθε εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα

η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HeLa υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$



**Εικόνα 10 :** α) αντικειμενοφόρος πλάκα *Neubauer* και καλυπτρίδες  
β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του

### 2.2.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0. Η ανάλυση συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές  $IC_{50}$  και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο έγινε κατά Spearman.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση 18 εκχυλισμάτων φυτών από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa). Τα εκχυλίσματα ήταν αρχικά σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν σε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O, αναλόγως της αρχικής τους ποσότητας. Η μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το XTT assay. Η χρονική διάρκεια της επώασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά HeLa ήταν σε κάθε περίπτωση 24 ώρες. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όταν αυξάνεται η δόση των εκχυλισμάτων, παρατηρείται αύξηση και της αναστολής στην αύξηση των κυττάρων. Οι τιμές IC<sub>50</sub> (τιμές στις οποίες πεθαίνει το 50% των κυττάρων) είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής κάθε εξεταζόμενου εκχυλίσματος. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub>, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της κυτταρικής, αύξησης που παρουσιάζει το εκάστοτε εκχύλισμα.

Πιο συγκεκριμένα:

Μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω εκχυλισμάτων:

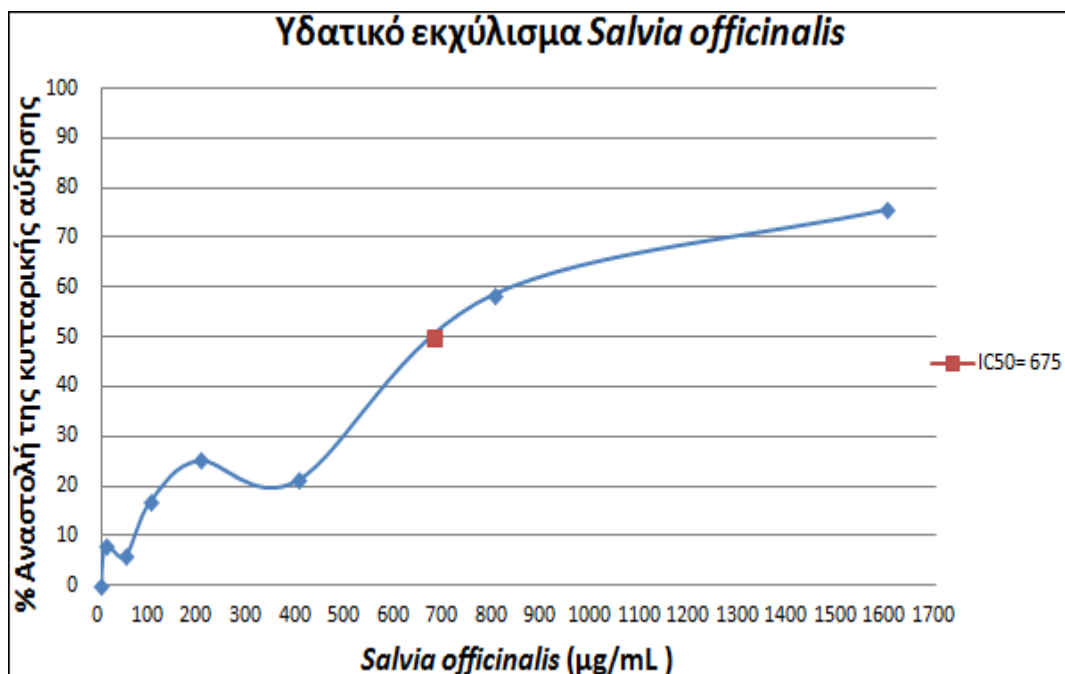
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia officinalis* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 75% στα 1600 µg/mL. IC<sub>50</sub>=675 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia pomifera pomifera* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 89% στα 800 µM. IC<sub>50</sub>=486 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia pomifera calveina* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 86% στα 1600 µg/mL. IC<sub>50</sub>=260 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia fruticosa* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 94% στα 800 µg/mL. IC<sub>50</sub>=425 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 45% στα 1600 µg/mL. Στο εκχύλισμα αυτό δεν παρατηρήθηκε IC<sub>50</sub> εντός του εύρους των

συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, ενώ κρίθηκε σκόπιμο να μην εξεταστεί η δραστηριότητα του εκχυλίσματος και σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, μιας και τότε θα υπερβαίναμε κατά πολύ το επιθυμητό εύρος τιμών, στο οποίο είναι χρήσιμο να βρεθεί πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα.

- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis clandestina clandestina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200 και 400  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 50% στα 400  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=400 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia sclarea*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 5,10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 83% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=980 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia argentea*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200 και 400  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 93% στα 400  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=110 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis clandestina peloponnesiaca*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 91% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=1075 \mu\text{g/mL}$ .
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Sideritis clandestina peloponnesiaca*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 87% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=490 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis raeseri raeseri*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 97% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=950 \mu\text{g/mL}$ .
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Sideritis raeseri raeseri*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 87% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=300 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Mentha longifolia*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 64% στα 400  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=287 \mu\text{g/mL}$ .
- Υδατικό εκχύλισμα *Mentha pulegium pulegium*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 77% στα 1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}=420 \mu\text{g/mL}$ .
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia sclarea*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 89% στα

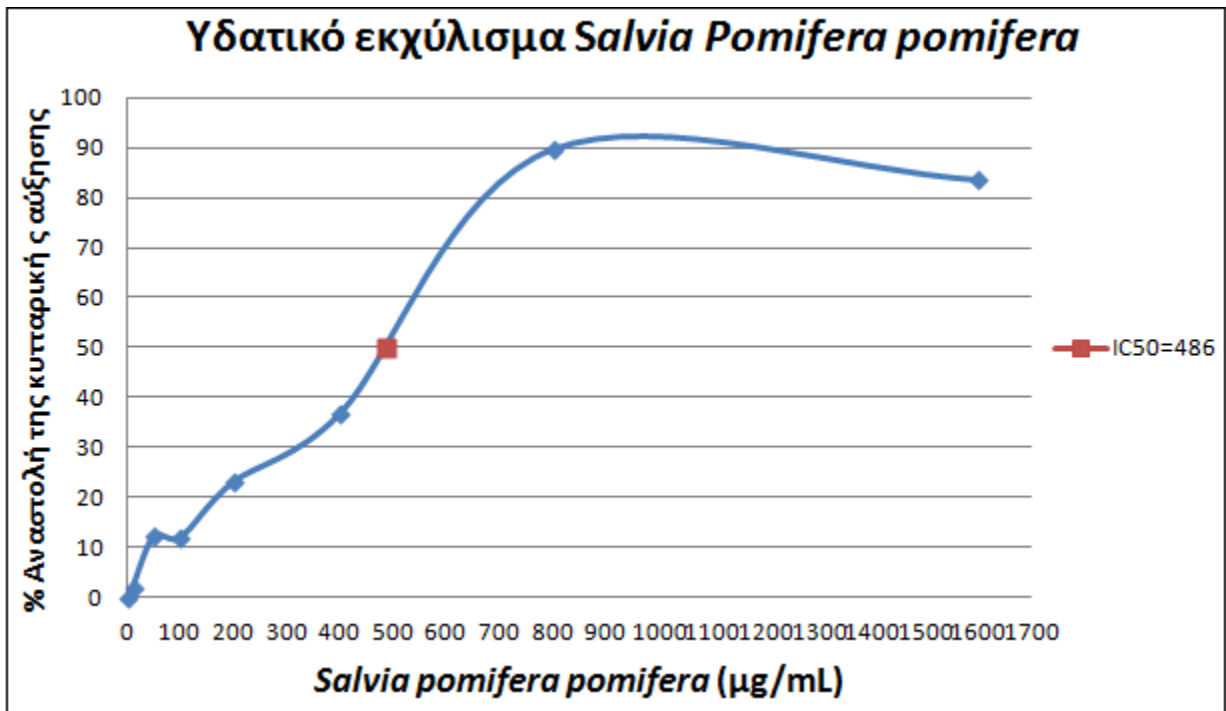
1600  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$ =435  $\mu\text{g/mL}$ .

- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia officinalis*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% (πλήρης αναστολή) στα 800  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$ =490  $\mu\text{g/mL}$ .
  - Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia calveina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 90% στα 800  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$ =450  $\mu\text{g/mL}$ .
  - Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia pomifera pomifera*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$  και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% (πλήρης αναστολή) στα 800  $\mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$ =300  $\mu\text{g/mL}$ .
- Στα διαγράμματα 19 και 20 φαίνονται οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  που παρουσίασε το σύνολο των εκχυλισμάτων και η συσχέτιση των τιμών αυτών με το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων (TPC) αντίστοιχα.

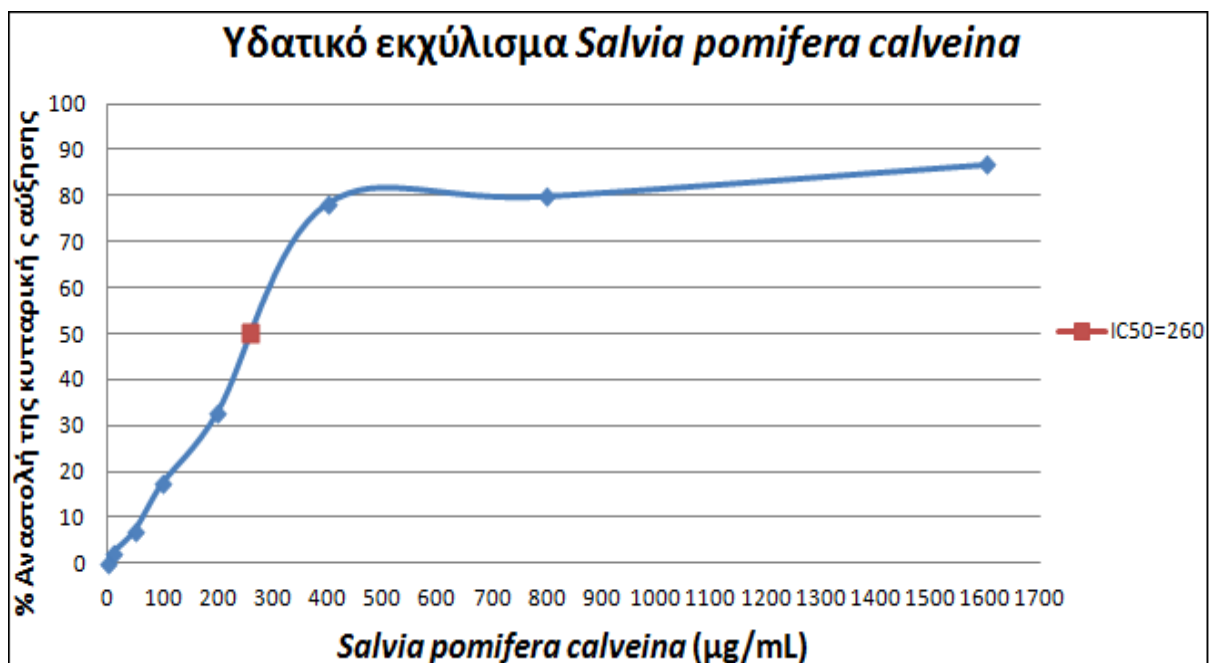


**Γράφημα 1:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*.

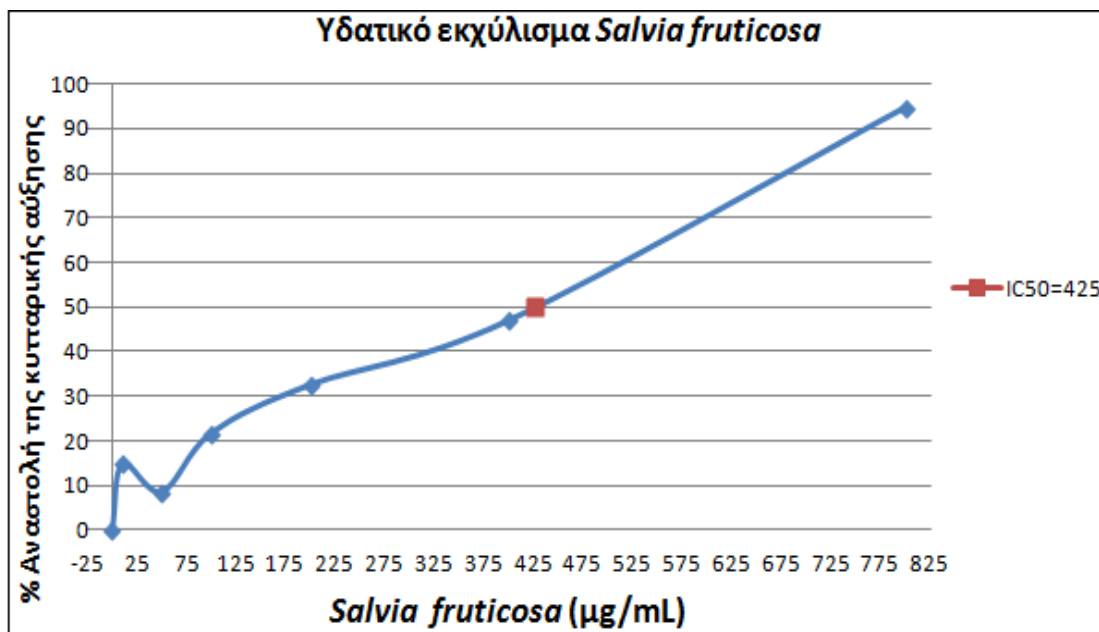




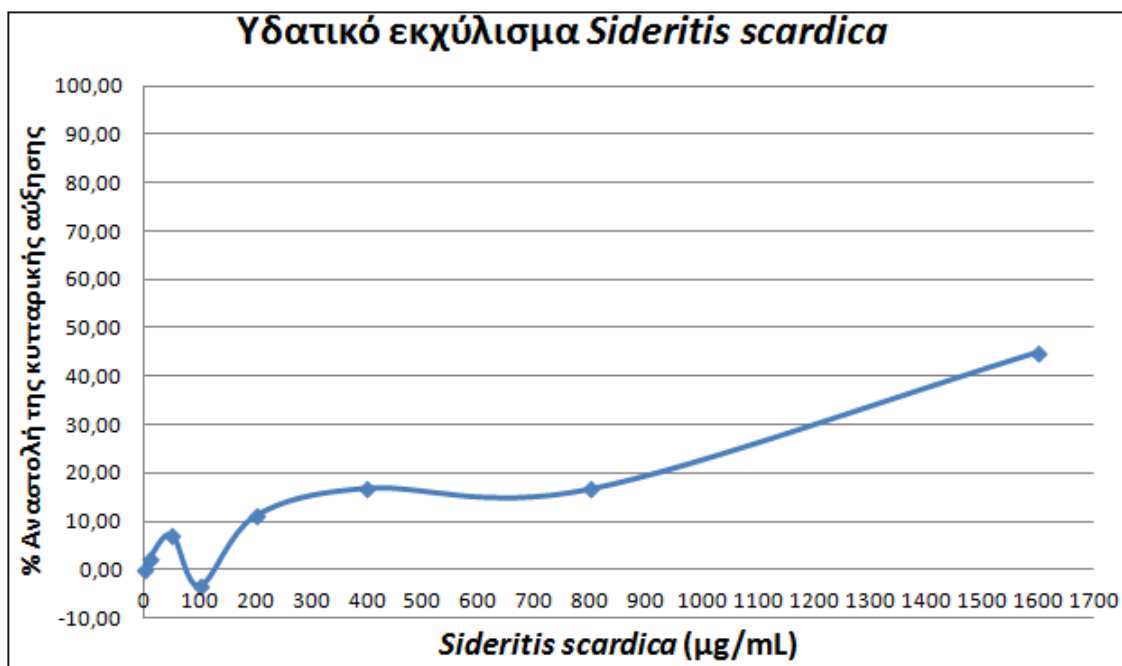
**Γράφημα 2:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*.



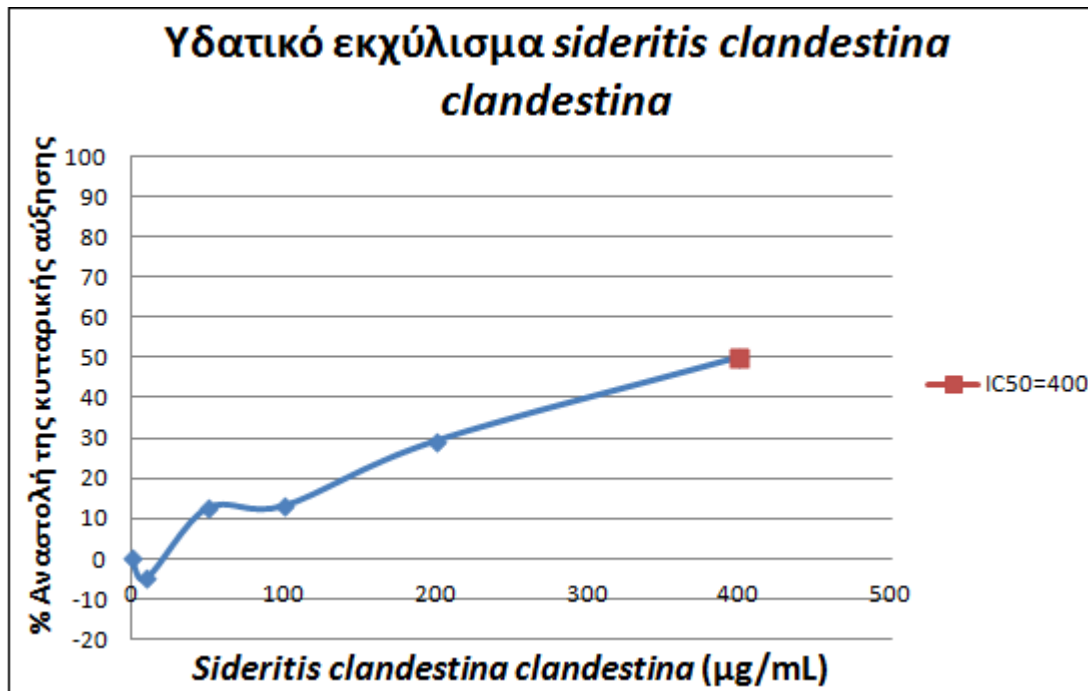
**Γράφημα 3:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calveina*.



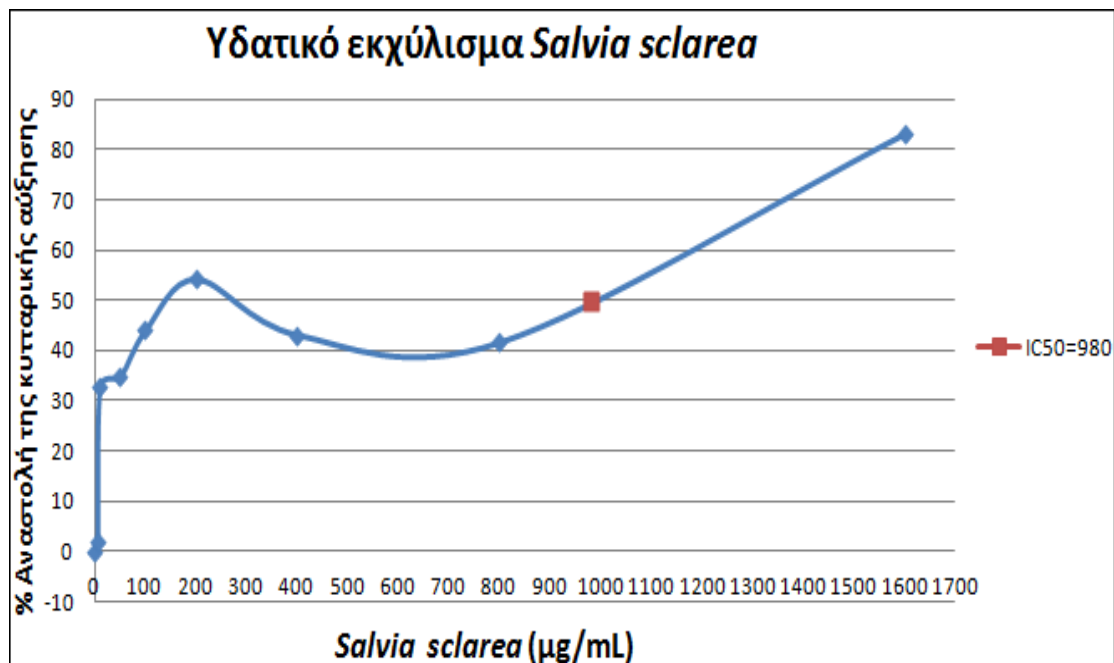
**Γράφημα 4:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa*.



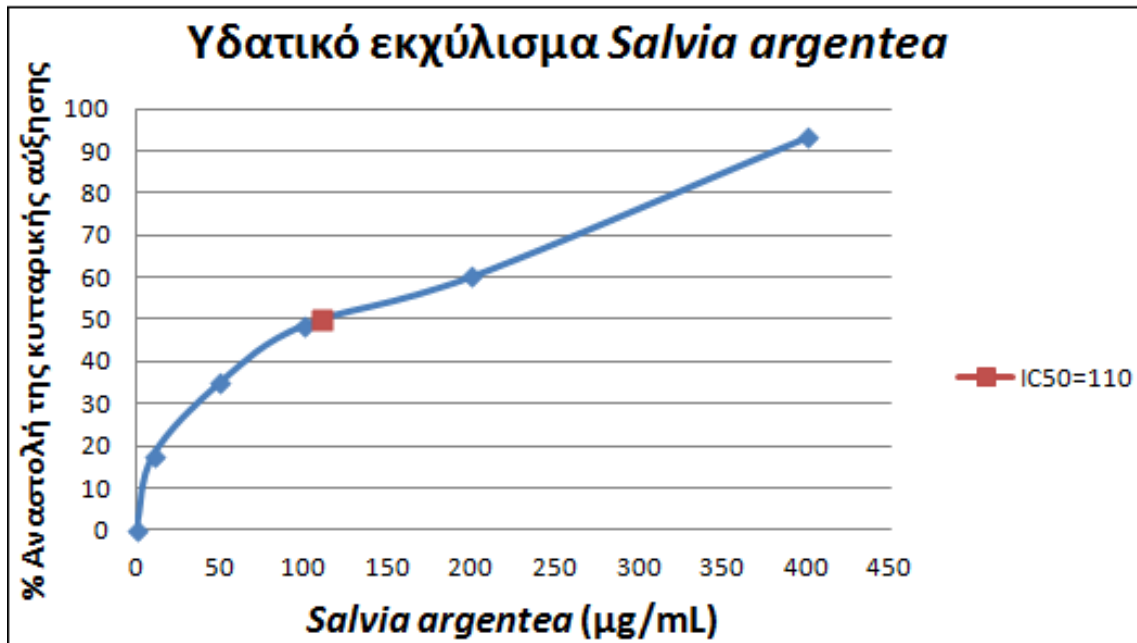
**Γράφημα 5:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*.



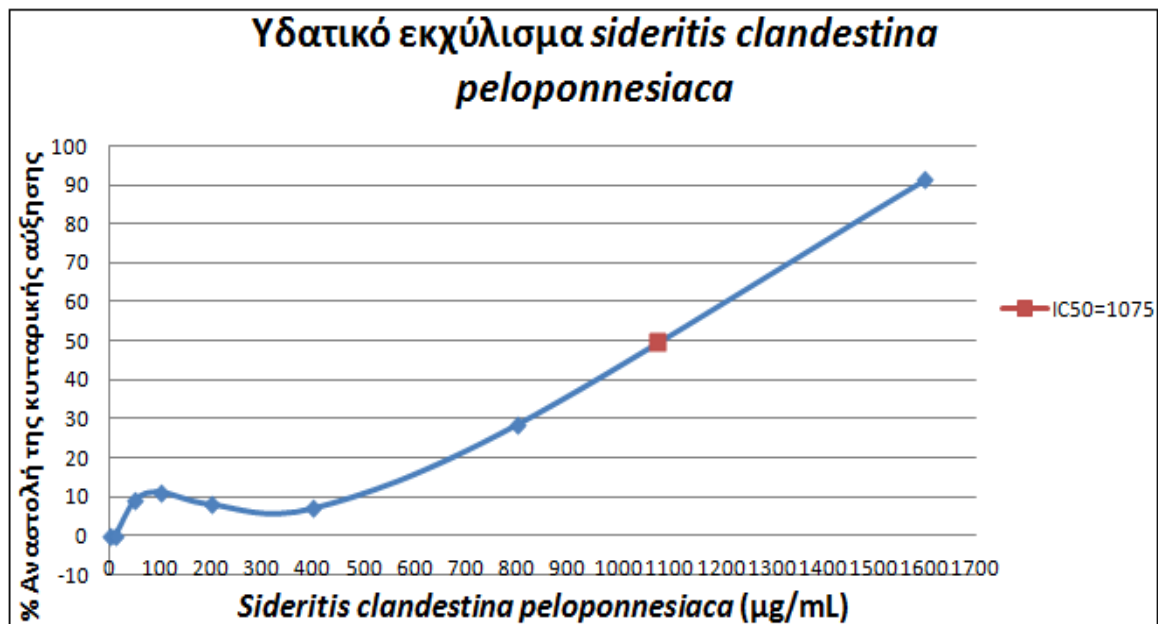
**Γράφημα 6:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestina*.



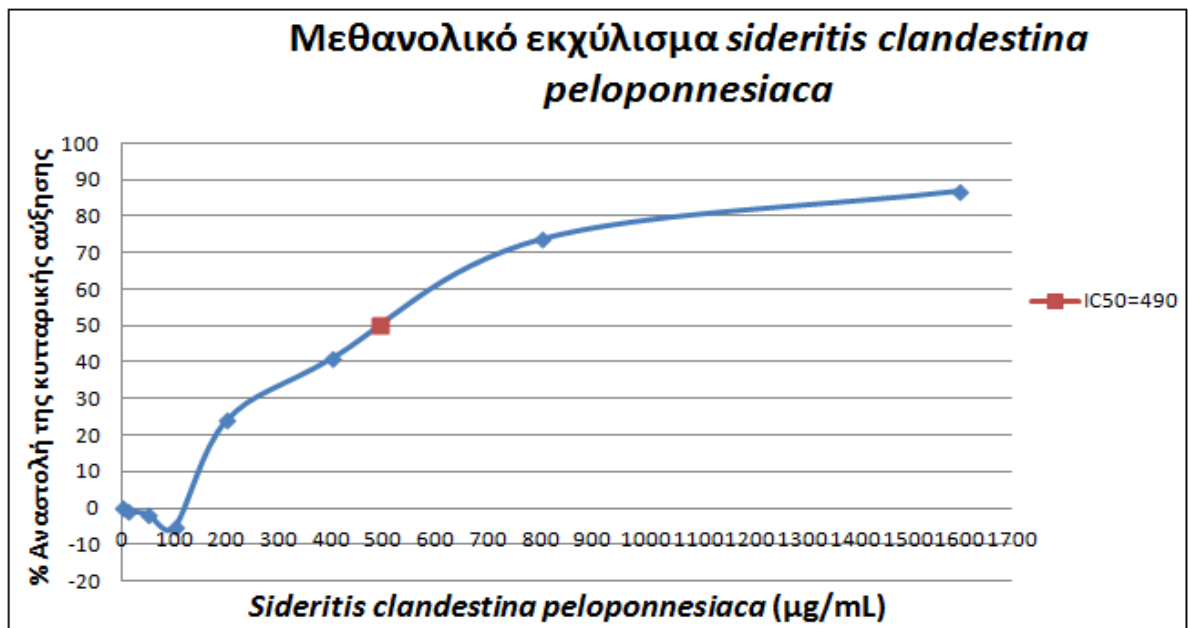
**Γράφημα 7:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*.



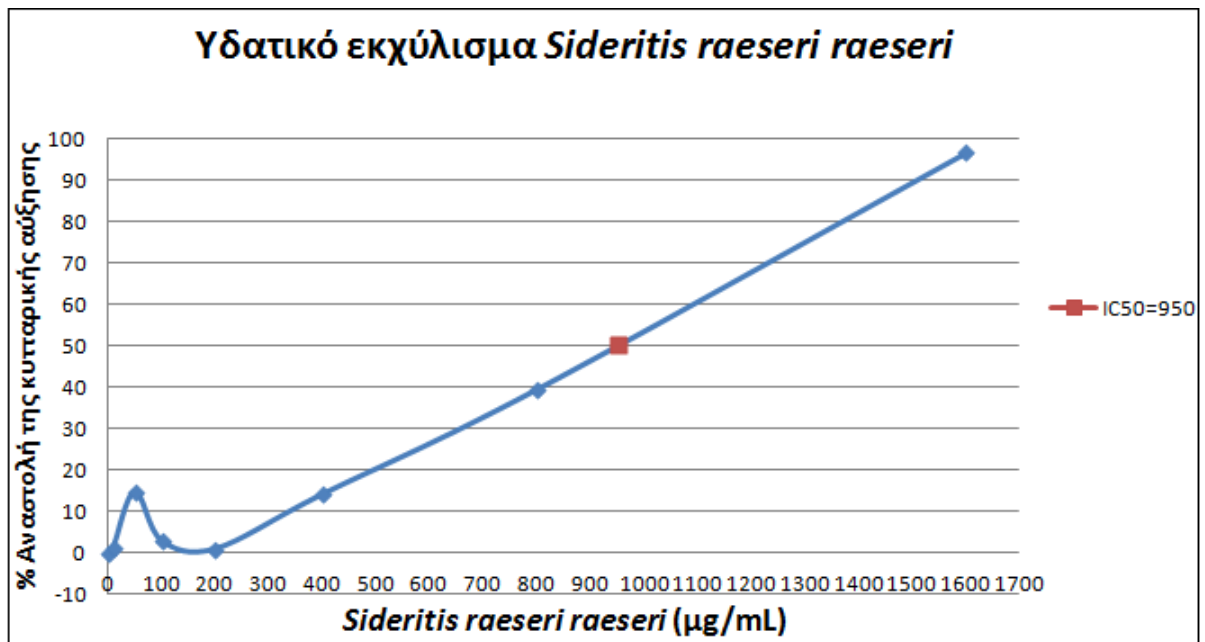
**Γράφημα 8:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia argentea*.



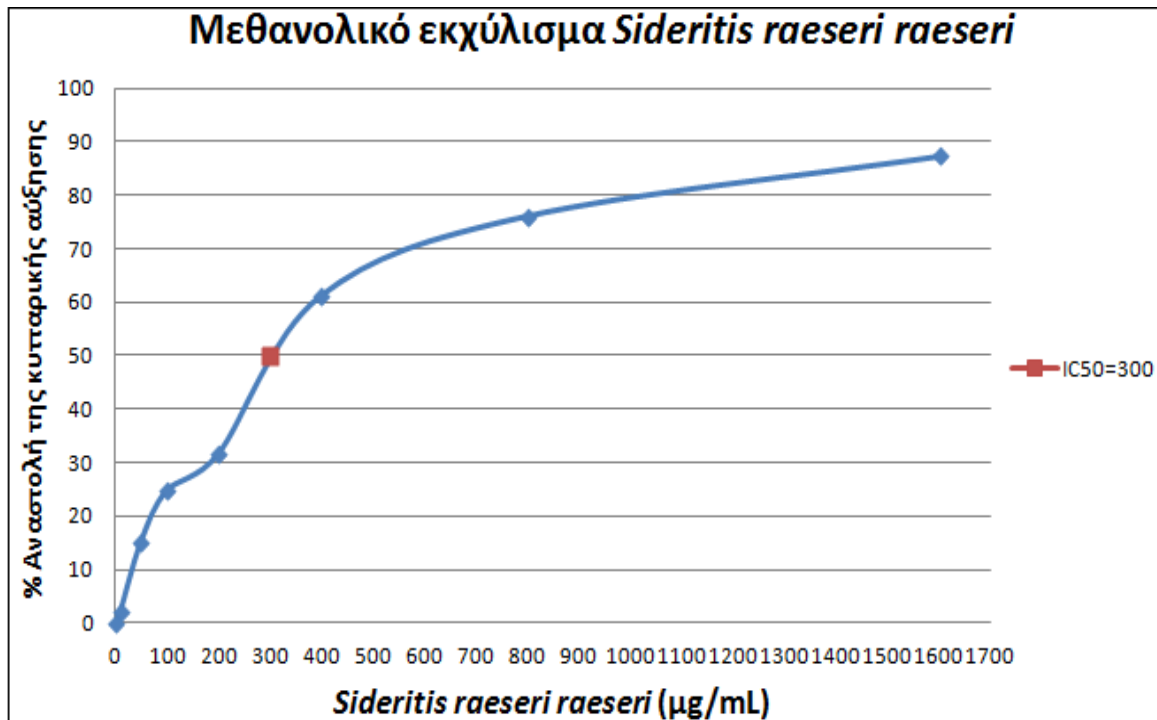
**Γράφημα 9:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloponnesiaca*.



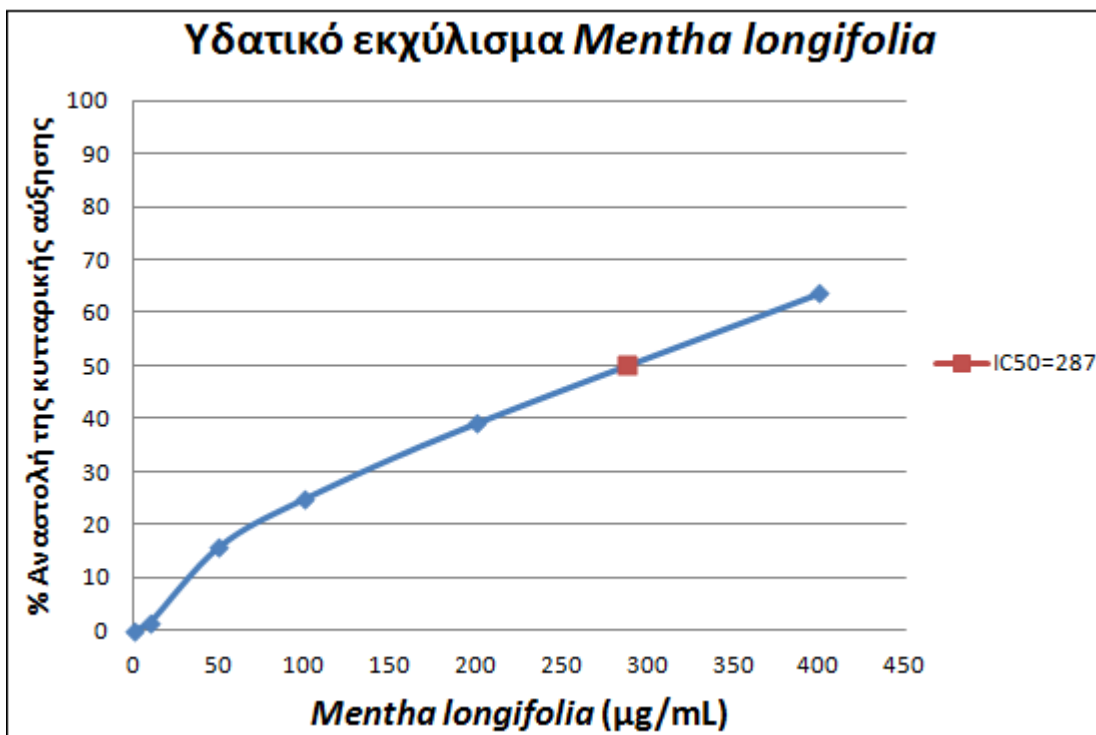
**Γράφημα 10:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloponnesiaca*.



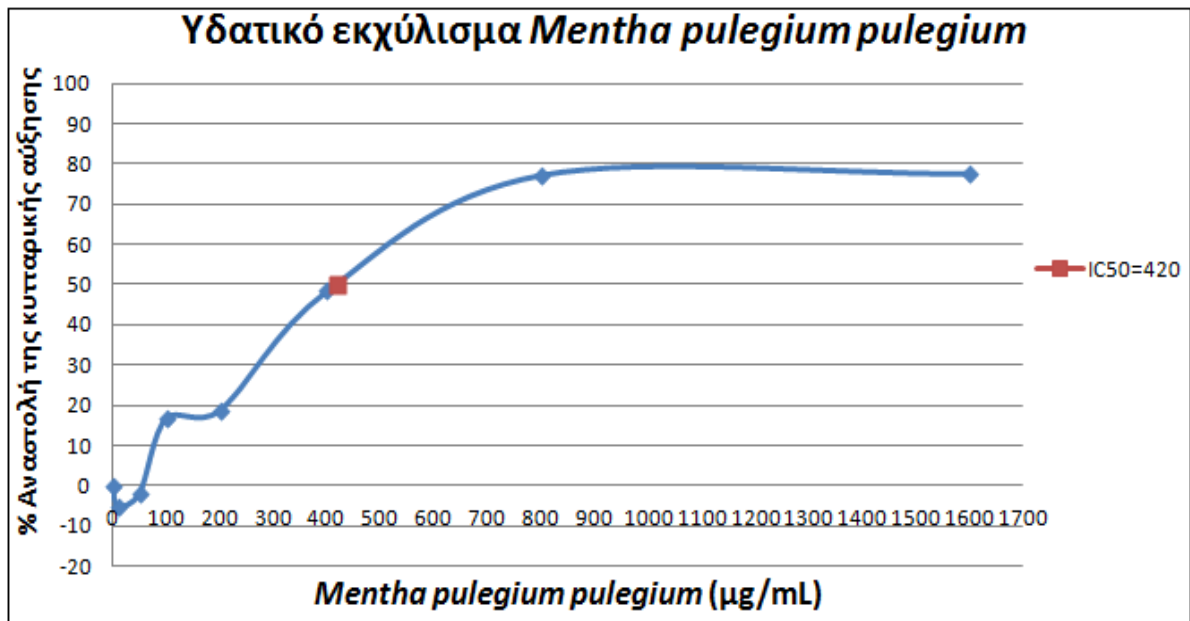
**Γράφημα 11:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*.



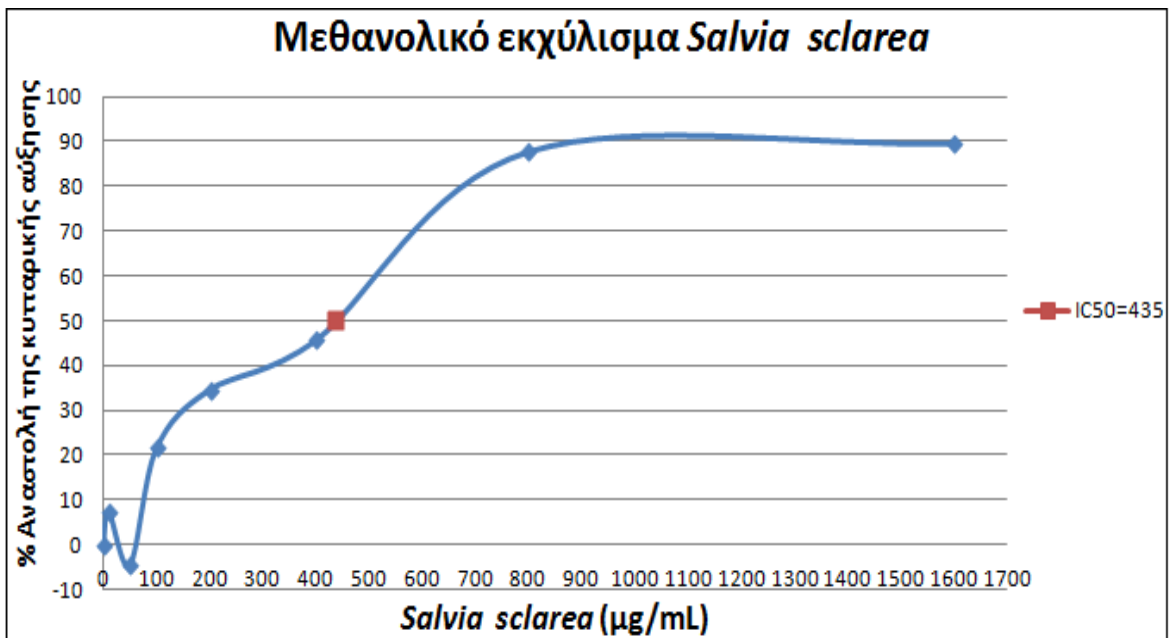
**Γράφημα 12:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*.



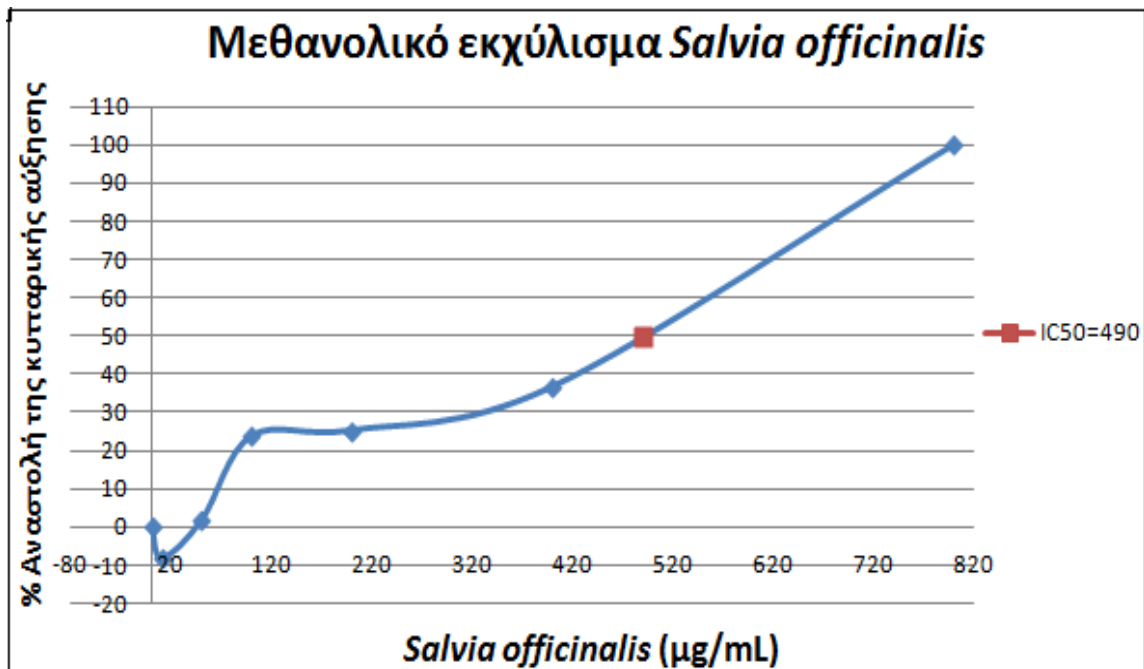
**Γράφημα 13:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το υδατικό εκχύλισμα της *Mentha longifolia*.



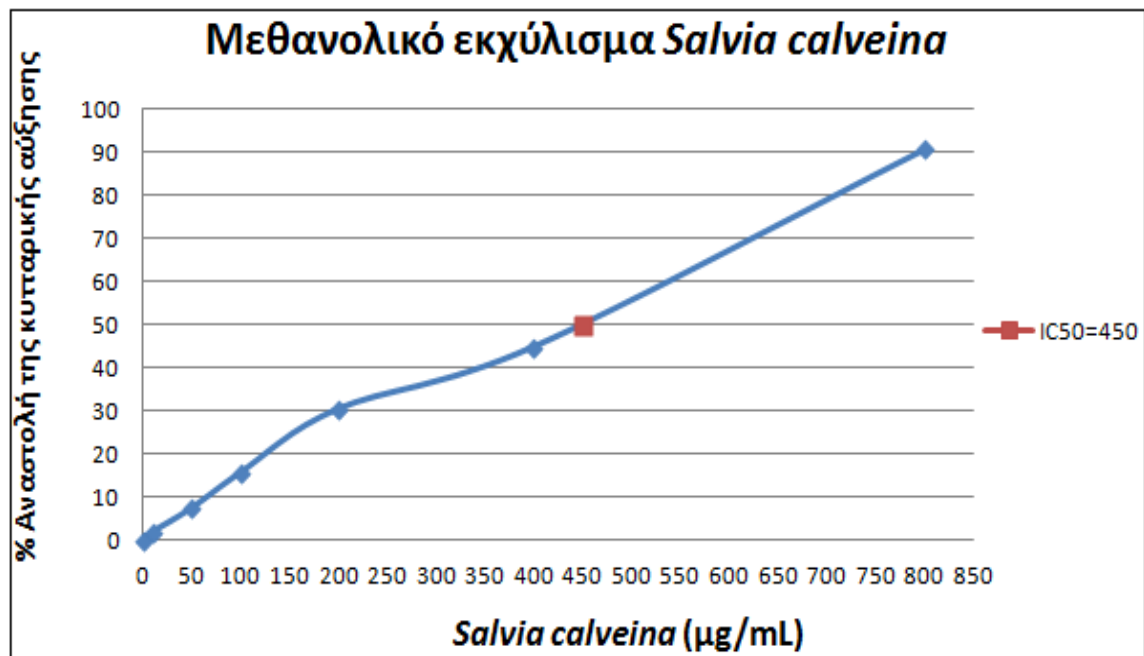
**Γράφημα 14:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το υδατικό εκχύλισμα της *Mentha pulegium pulegium*.



**Γράφημα 15:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*.

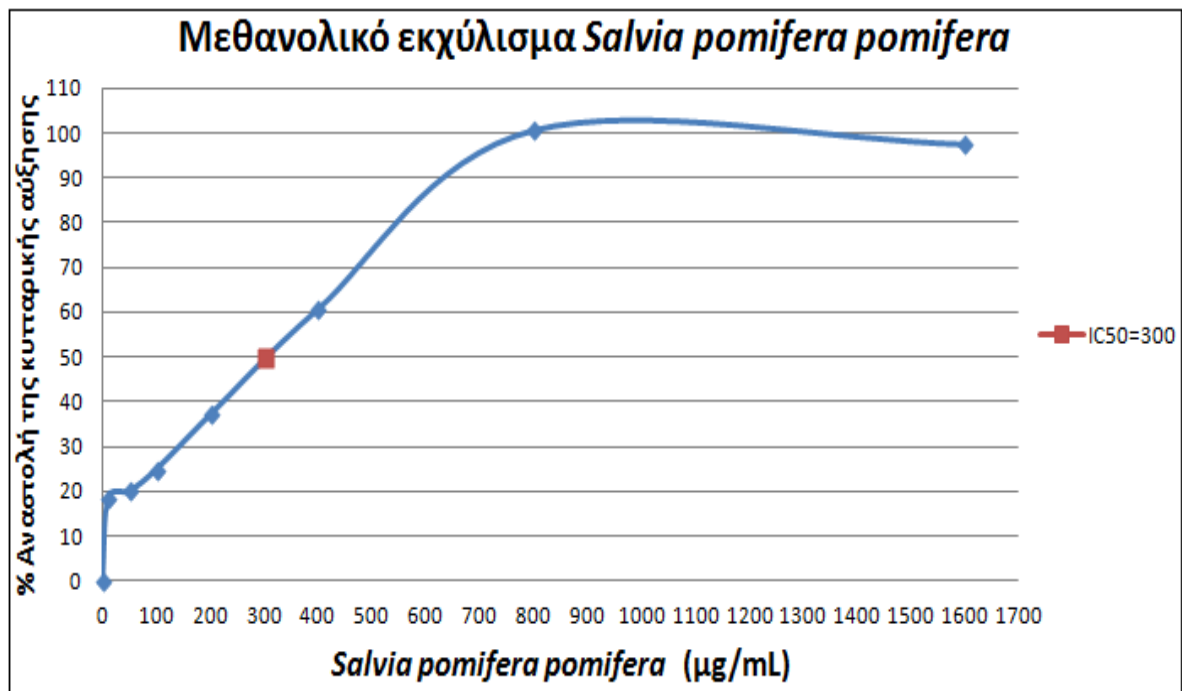


**Γράφημα 16:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*.

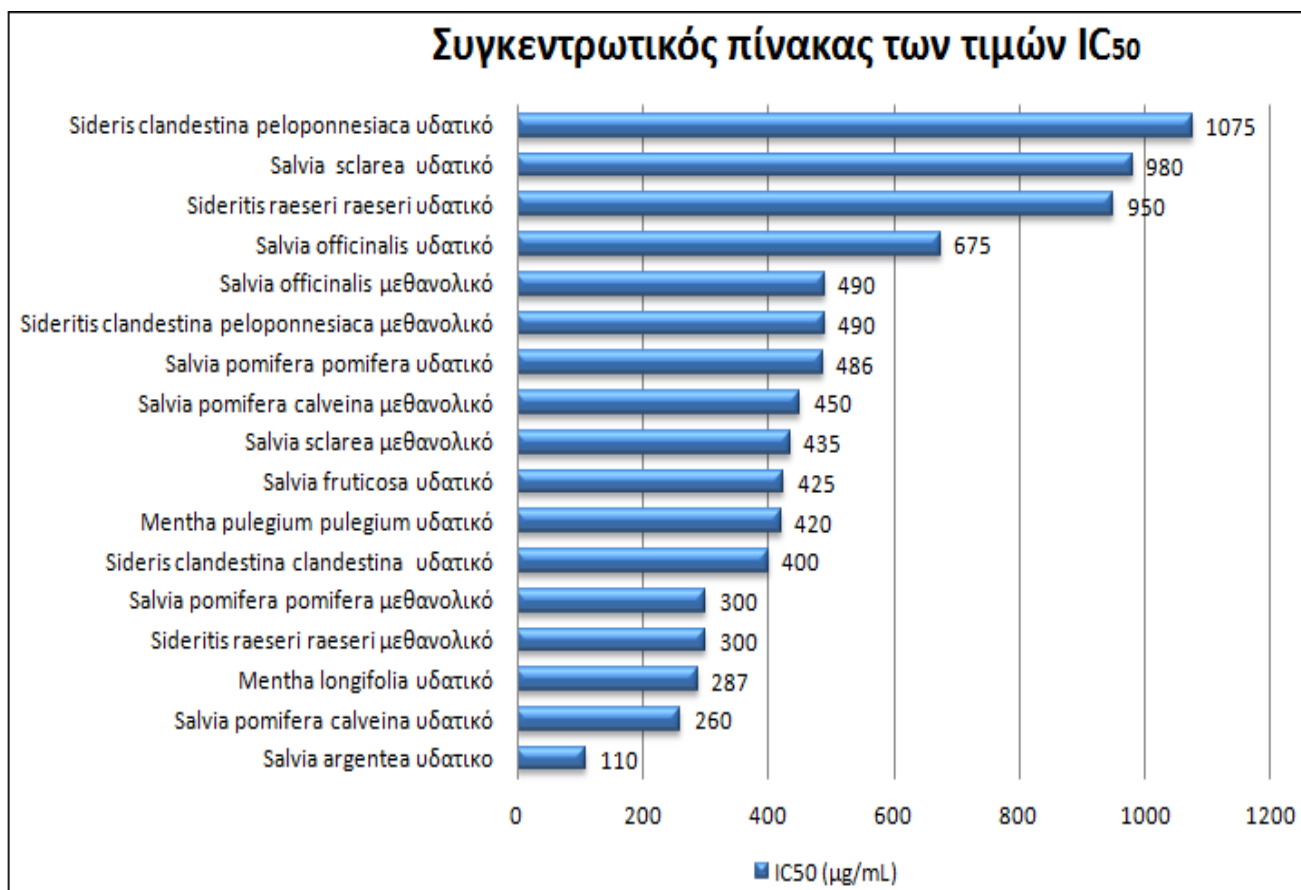


**Γράφημα 17:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων HeLa από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia calveina*.

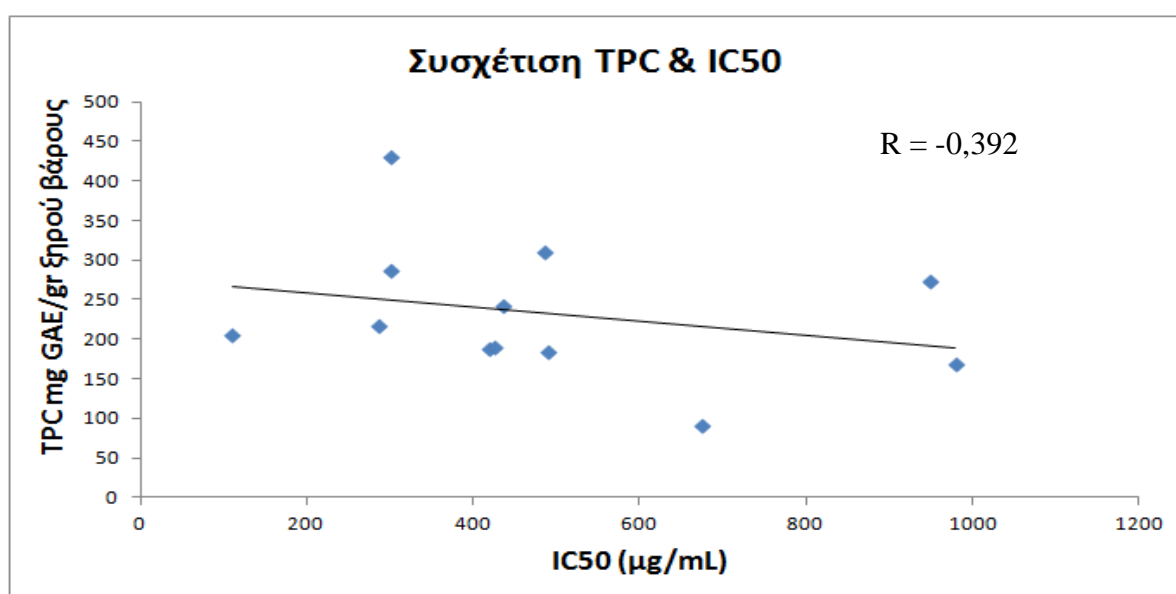




**Γράφημα 18:** Επί % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των κυττάρων *HeLa* από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*.



**Γράφημα 19:** Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC<sub>50</sub>. Σημειώνεται ότι στο διάγραμμα δεν απεικονίζεται το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*, μιας και όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο διάγραμμα δεν παρουσίασε IC<sub>50</sub> στο εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν (10-1600µg/mL).



**Γράφημα 20:** Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές IC<sub>50</sub> και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Ο καρκίνος είναι μια πάθηση η οποία μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος, αποτελώντας τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ο όρος αναφέρεται σε περίπου 150-200 διαφορετικές παθήσεις, που έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά στοιχεία: την ανεξέλεγκτη αύξηση των κυττάρων και τις δυσλειτουργίες οι οποίες προκαλούνται από αυτήν. Ο Ιπποκράτης ήταν αυτός που έδωσε στην πάθηση του καρκίνου το όνομα της. Πολύ αργότερα, ο Valsalva, το 1704 υποστήριξε ότι αρχικά ο καρκίνος ήταν ένα τοπικό φαινόμενο που μπορούσε να αφαιρεθεί χειρουργικά, ενώ σε πιο προχωρημένο στάδιο ο καρκίνος μπορούσε μέσω των λεμφαγγείων να μεταφερθεί αλλού στο σώμα. Στις μέρες μας είναι πλέον γνωστό πως η καρκινογενετική διαδικασία αποτελεί μια πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μια εκτεταμένη χρονικά περίοδο, που μεσολαβεί μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης και της εμφάνισης της νόσου.

Εκτός από τη θεραπεία, η έρευνα για τον καρκίνο εστιάζεται και στην πρόληψη. Η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών μέσω της διαίτας ή με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής με στόχο την προστασία από διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, θεωρείται μια από τις σημαντικότερες σύγχρονες στρατηγικές πρόληψης. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια και ιδιαίτερη βάση έχει δοθεί στην χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινόλων που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας. Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων και έχουν σημαντικές αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Crozier et al., 2009). Οι πολυφαινόλες φαίνεται να δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Bidlack et al., 2000).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα γένη των φυτών *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για τη μελέτη της επίδρασης των

εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HeLa χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 18 και ήταν τόσο υδατικής, όσο και μεθανολικής σύστασης. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος πιο διαδεδομένος τύπος καρκίνου μεταξύ των γυναικών. Ξεκινά από προκαρκινικές αλλοιώσεις που συνήθως μετά από αρκετά χρόνια μετατρέπονται σε αληθείς διηθητικούς καρκίνους. Επεμβαίνοντας στο αρχικό στάδιο και θεραπεύοντας όλους τους προκαρκίνους μπορούμε να προλάβουμε σχεδόν όλους τους αληθείς καρκίνους. Υπό την παραπάνω άποψη εξετάστηκαν και τα παραπάνω εκχυλίσματα για πιθανή επίδρασή τους στα κύτταρα HeLa, μιας και σύμφωνα με άλλες μελέτες έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτο πολυφαινολικό φορτίο και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Stagos D. et al 2012).

Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 10 εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά από είδη του γένους *Salvia* (*Salvia officinalis*, *Salvia pomifera pomifera*, *Salvia pomifera calveina*, *Salvia fruticosa*, *Salvia argentea*, *Salvia sclarea*), 2 υδατικά εκχυλίσματα από το γένος *Mentha* (*Mentha pulegium pulegium* και *Mentha longifolia*) και 6 εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά, από είδη του γένους *Sideritis* (*Sideritis raeseri raeseri*, *Sideritis clandestina peloponnesiaca*, *Sideritis scardica*, *Sideritis clandestina clandestina*). Από όλα τα παραπάνω εκχυλίσματα την πιο ισχυρή δράση (μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub>) εμφάνισαν, αρχίζοντας από το ισχυρότερο, τα υδατικά εκχυλίσματα από τα είδη: *Salvia argentea*, *Salvia pomifera calveina* και *Mentha longifolia*. Γενικά η σειρά ισχύος από τα τρία γένη χειλανθών που εξετάστηκαν έχει ως εξής: **Mentha** (μ.ο IC<sub>50</sub> = 353,3μg/mL) > **Salvia** (μ.ο IC<sub>50</sub> = 461,1μg/mL) > **Sideritis** (μ.ο IC<sub>50</sub> = 643μg/mL).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HeLa με τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονταν από 110 έως 1075 μg/mL. Ανάμεσα στα εκχυλίσματα από το γένος *Salvia* την πιο ισχυρή αντικαρκινική ιδιότητα εμφάνισε το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia argentea* με IC<sub>50</sub> = 110μg/mL. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα του γένους *Sideritis* ήταν το μεθανολικό εκχύλισμα από το είδος *Sideritis raeseri raeseri* με τιμή IC<sub>50</sub> = 300μg/mL. Σε ότι αφορά το γένος *Mentha* μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (287 μg/mL) εμφάνισε το υδατικό εκχύλισμα του είδους *Mentha longifolia*.

Το γεγονός ότι από το σύνολο των 18 εκχυλισμάτων τα τρία ισχυρότερα εκχυλίσματα είναι υδατικά, ίσως υποδεικνύει ότι πολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για την αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτό το σημείο αξίζει να

τονίσουμε πως όπως φάνηκε και από την ανάλυση συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές IC<sub>50</sub> και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC), κατά Spearman, οι δύο τιμές φαίνεται να μην έχουν άμεση σύνδεση μεταξύ τους, παρουσιάζοντας μία ελαφρώς αρνητική συσχέτιση. Ωστόσο, κατά τη συσχέτιση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με την ανασταλτική δράση που παρουσιάζουν έναντι καρκινικών κυττάρων, παρόλο που «ο κανόνας» δείχνει να μην υπάρχει μεγάλη συσχέτιση, υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως π.χ στην περίπτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος *Sideritis raeseri raeseri*, όπου έχουμε υψηλό TPC και μικρό IC<sub>50</sub> ή στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος *Salvia sclarea*, όπου έχουμε μικρή τιμή TPC και μεγάλο IC<sub>50</sub>. Επίσης, και σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, στην οποία είχαν μελετηθεί ορισμένα είδη από τα γένη *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis*, με τα οποία ασχολήθηκε και η παρούσα μελέτη, είχε φανεί πως το συνολικό πολυφαινολικό φορτίο του κάθε είδους εμφανίζει πολύ μικρή συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που αυτό εμφανίζει (Stagos et al., 2012). Αυτό ίσως μπορεί να εξηγηθεί από τα παρακάτω: 1) η αντικαρκινική δραστηριότητα που τα εκχυλίσματα εμφανίζουν ίσως δεν οφείλεται μόνο στις πολυφαινόλες αλλά και σε άλλες φυτοχημικές ενώσεις 2) επίσης μπορεί να εμφανίζεται ένα είδος συνέργειας ανάμεσα στις πολυφαινόλες και στις άλλες φυτοχημικές ενώσεις 3) η αντικαρκινική δραστηριότητά τους μπορεί να οφείλεται σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες, που είναι παρούσες μόνο στα εκχυλίσματα και όχι στο συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο. Για παράδειγμα, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Μυλωνάς Φ., 2012) ανιχνεύθηκαν στα είδη του γένους *Salvia* τα καθαρά πολυφαινολικά μόρια Salvianolic acid K (σαλβιανολικό οξύ K), Luteolin 3-O-glucuronide (3-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης) και Luteolin (λουτεολίνη), ενώ στο γένος *Mentha* ανιχνεύθηκαν τα καθαρά πολυφαινολικά μόρια Luteolin 7-O- glucoside (7-O-γλυκοσίδιο της λουτεολίνης), Rosmarinic acid (ροσμαρινικό οξύ), Luteolin 7-O- rutinoside και Eriodictyol 7-O- rutinoside (eriodictin). Από αυτά τα καθαρά μόρια το πιο δραστικό που απομονώθηκε από το γένος *Mentha* ήταν το ροσμαρινικό οξύ με IC<sub>50</sub>= 70 μM για τα HeLa κύτταρα, ενώ για το γένος *Salvia* το πιο δραστικό μόριο φάνηκε να είναι η λουτεολίνη με IC<sub>50</sub>= 29 μM.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως όλα τα εκχυλίσματα εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των μελετηθέντων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa). Επίσης αποτελούν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, μιας και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φυτικά εκχυλίσματα με τιμές IC<sub>50</sub> από 100-1000 μg/mL, εμφανίζουν αρκετά ισχυρή αντικαρκινική δράση. Μοναδικές

εξαιρέσεις σε αυτό αποτελούν τα υδατικά εκχυλίσματα από τα είδη *Sideritis scardica* και *Sideritis clandestina peloponnesiaca*, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μη πιθανοί ανασταλτικοί παράγοντες της αύξησης των καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με τις τιμές  $IC_{50}$  που παρουσίασαν (Gad-Shayne C, 2009). Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, στην οποία εξετάζονται τα προαναφερθέντα είδη των φυτών από τα γένη *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis*. Στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία αναφορά για την πλειονότητα των ειδών που εμείς μελετήσαμε, ενώ για λίγα είδη τα οποία συναντά κανείς στη βιβλιογραφία, π.χ *Salvia officinalis*, είτε μελετάται μόνο η σύσταση τους, είτε μελετάται η επίδρασή τους σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως αυτές του προστάτη και του στήθους, είτε τα φυτά δεν προέρχονται από τον ελλαδικό χώρο. Όπως είναι γνωστό ίδιες φυτικές ποικιλίες που προέρχονται από διαφορετικές όμως περιοχές μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση βιοδραστικών στοιχείων, λόγω των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών και άρα είναι πιθανό να παρουσιάζουν και διαφορετική βιολογική δράση.

Αναφορικά με άλλες μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν κάποια από τα είδη, τα οποία και εμείς χρησιμοποιήσαμε, βρέθηκε πως:

- υδατικά εκχυλίσματα από *Mentha longifolia* τα οποία εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7) και του προστάτη (LNCaP) παρουσίασαν αντίστοιχα τιμές  $IC_{50}$  45,2 και 43,5  $\mu\text{g/mL}$  (Abdullah I Hussain et al, 2010).
- Μεθανολικά εκχυλίσματα από *Mentha pulegium*, που εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα εντέρου Caco-2, ήπατος HepG2 και μαστού MCF-7 παρουσίασαν τιμές  $IC_{50}$  μεγαλύτερες από 75  $\mu\text{g/mL}$  (Badisa R.B. et al, 2004).
- Υδατικά εκχυλίσματα από *Salvia officinalis*, τα οποία εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα πλακώδους επιθηλίου HNSCC εμφάνισαν τιμή  $IC_{50}$  135  $\mu\text{g/mL}$  (Sertel S. et al, 2011).

Για την πρόοδο της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο μένει να ακολουθήσουν και άλλες εργασίες που θα εξετάζουν την επίδραση των παραπάνω εκχυλισμάτων και σε άλλες κυτταρικές σειρές, τους μηχανισμούς δράσης τους καθώς και τα επίπεδα ανεκτικότητάς τους από τον οργανισμό. Περαιτέρω έρευνες σε μοριακό επίπεδο απαιτούνται για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

### ➤ Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Γκόλιαρης, Α. 1987. *Η βελτίωση στο τσάι του βουνού (Sideritis L.)*  
Επιστημονικό δελτίο τμήματος αρωματικών φυτών ΚΓΕΜΘ σελ. 27-32.  
Θεσ/νίκη.
- Ζαννέτου-Παντελή Κ. 2000. *Η θεραπευτική δυνατότητα των φαρμακευτικών φυτών της Κύπρου*. Λάρνακα 2000.
- Κουλάδη Μαρία , 2005. *Χημικά συστατικά ειδών του γένους Salvia L.*  
Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «Το Ελληνικό Φασκόμηλο» , Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005 Υπό την αιγίδα του Πανελληνίου φαρμακευτικού συλλόγου.
- Κουρέτας Δ. *Βιοχημική Τοξικολογία*. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
- Κωνσταντίνου Α. *Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου*. Περγαμνή-Ετήσια έκδοση του Πανεπιστημίου Κύπρου 2008.
- Λαζάρη Δ., 2005. *Το Ελληνικό Φασκόμηλο*. Πρακτικά συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005.
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α. *Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία*. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14, 1997.
- Σπανού Χρυσούλα. *Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών*, 2010.

### ➤ Ξένη Βιβλιογραφία:

- Abdullah I Hussain, Farooq Anwar, Poonam S Nigam, Muhammad Ashraf and Anwarul H Gilani, seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species, 2010, society of chemical industry, 90:1827-1836
- Adlercreutz H, Mazur W., *Phyto-oestrogens and Western diseases*, Ann Med. 1997 29:95–120.
- American cancer society, “what causes cancer of the cervix”, 2006-11-30.

- Ames BN, Gold LS, Willett WC: The causes and prevention of cancer, 1995, Proc Nat Acad Sci USA, 92: 5258-5265.
- Astill, R., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., Martin, P. T., *Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions*, J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5340 –5347.
- Badisa R.B., Tzakou O., Couladis M. and Pilarinou E., Cytotoxic Activities of some Greek Labiatae Herbs, *Phytotherapy research*, 2004, 17: 472 – 476
- Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Ginanti D. Carcinogenic and anticarcinogenic food components. Taylor & Francis Group, 2006.
- Bayrak, A., & Akgul, A. (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species. Phytochemistry*, 26, 846–847.
- Beibei Lu, Ambuj Kumar, Xavier Castellsagué, Anna R Giuliano. *Efficacy and Safety of Prophylactic Vaccines against Cervical HPV Infection and Diseases among Women: A Systematic Review & Meta-Analysis*. BMC Infect Dis. 2011, 11: 13.
- Bertelli A, Bertelli A.A, Gozzini A, Giovannini L. *Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity*. Drugs Exp Clin Res., 1998 24:133–138.
- Bidlack WR, Omay S.T, Meskin M.S, Topham DKW, 2000, *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC Press
- Blamey, M. & Grey-Wilson, C., 1989, *Flora of Britain and Northern Europe*.
- Bode AM, Dong Z. *Molecular and cellular targets*. Mol Carcinog., 45:422–430, 2006.
- Brickell Christopher, Zuk Judith D. (1997). *The American Horticultural Society: A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. New York, NY, USA: DK Publishing. p. 668. ISBN 0-7894-1943-2
- Cairns J : Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, Nature, 255: 197-200.
- Centers for Disease Control and Prevention, May 2010, “FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the advisory committee on immunization practice, *Morbidity and mortality weekly report*, 626–9



- Cheynier V. *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. Am J Clin Nutr, 81:223-9, 2005
- Clebsch Betsy, Carol D. Barner (2003). *The New Book of Salvias*. Timber Press. p. 18.
- Clifford M.N, Scalbert A. *Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention*. J Food Sci Agric. 2000 80:1118–1125.
- Crozier A, Clifford M.N, Ashihara J. *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, 2006
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.B. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Reports*, 26: 1001-1043, 2009.
- Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol 7. Edinburgh University Press: Edinburgh, 1982, 400–461
- De Flora S, Ferguson L. *Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents*. Mut Res, 591: 8-15, 2005.
- De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albin A. *Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases*. Mutat Res. 2001 480-481:9-22.
- Delamare Longaray, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S., 2006. *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia Officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. Food Chemistry 100, 603–608.
- DeMay, M 2007, *Practical principles of cytopathology. Revised edition*. Chicago, IL: American Society for Clinical Pathology Press.
- Deutsche Welle, In Good Shape, March 2012.
- Dew TP, Day AJ, Morgan MR., 2005. *Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components*. J Agric Food Chem Aug 10;53(16):6510-5.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sci. 1999, 65(4):337-53.
- Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. *Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and*

*promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis*. Carcinogenesis. 1988 9:331-332.

- Formisano, C., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F., Rosselli, S., 2007. *GC and GC/MS analysis of the essential oil of Salvia hierosolymitana Boiss. growing wild in Lebanon*. Natural Product Communications 2, 181–184.
- Gadducci A, Barsotti, C, Cosio, S, Domenici, L, Riccardo Genazzani A Aug 2011, "Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature.", *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*
- Gad-Shayne C, 2009, Alternatives to in vivo studies in toxicology, in General and Applied Toxicology, Vol. 6. John Wiley & Sons Inc.
- Gali-Muhtasib, H., Hilan, C., Khater, C., 2000. *Traditional uses of Salvia libanotica (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils*. Journal of Ethnopharmacology 71, 513–520.
- González-Burgos E, Carretero M.E, Gómez-Serranilloz M.P, 2011, *Sideritis spp* :Uses, chemical composition and pharmacological activities- A review, Journal of Ethnopharmacology 135, 209-225
- Grady, Denise, February 1, 2010, "A Lasting Gift to Medicine That Wasn't Really a Gift", The New York Times.
- Gulluce M, Shain F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al, 2007, Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extracts from *Mentha longifolia* L. spp. *Longifolia*, Food Chem 103: 1449-1456
- Harborne J.B. *Nature, distribution and function of plant flavonoids*. Prog Clin Biol Res. 1986, 213:15-24.
- Hartman PE, Shankel DM. *Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules*, 1990, Environ Mol Mutagen, 15: 145-182.
- Hennings H, Shores R, Wenk M.L, Spangler E.F, Tarone R and Yuspa S.H : Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters, 1983, Nature, 304: 67-69.

- Hill DL, Grubbs CJ. *Retinoids and cancer prevention*. *Annu Rev Nutr*. 1992 12:161-181.
- Hohmann J, Zupko I, Redei D, Csanyi M, Falkay G, Mathe I, et al. (1999). *Protective effects of the aerial parts of Salvia officinalis, Melissa officinalis and Lavandula angustifolia and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation*. *Planta Medica*, 65, 576–578.
- Hoover R.N, Hyer M, Pfeiffer R.M, et al. Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine* 2011; published online October 6, 2011.
- Huang F.L, Roop D.R, De Luca L.M. *Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea*. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1986 22:223.
- Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. *Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis*. *Cancer Res*. 1991 51:813-819.
- Jordan VC. *The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer*. *Cancer*. 1992 70:977s-982s
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. *Inhibition of chemical carcinogenesis*. In: *Chemical induction of cancer modulation and combination of effects*. Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, 1997.
- Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. *Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention. Vol e. Humana Press, 2005.*
- Kennedy AR. *Chemopreventive agents: protease inhibitors*. *Pharmacol Ther*. 1998 78:167-209.
- Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E “*Herbs of the Labiatae*” Elsevier Science Ltd, 2004.
- Kokkini, S. 1994. *Herbs of the Labiatae*. Pp. 2342-2348 in *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* (R.M acrae, R. Robinson, M. Sadler and G Fullerlove, eds.). Academic Press, London.
- Koufos A, Hansen M.F, Copeland N.G, Jenkins N.A, Lampkin B.C and

Cavenee W.K : Loss of heterozygosity in the embryonal tumours suggests a common pathogenic mechanism, 1985, *Nature*, 316: 330-334.

- Kris Etherton P.M, Hecker K.D, Bonanome A, Coval S.M, Binkoski A.E, Hilpert K.F, Griel A.E, Etherton T.D, 2002. *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. *Am J Med* 113:S71-88.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, 2007, *Robbins Basic Pathology*, 8th ed., Saunders Elsevier., pp. 718–721.
- Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., Lin, J. K., *Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves*, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1864–1873.
- Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G.A., de Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F., 2008. *In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes*. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 109–116.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F., 2007. *Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models*. *Anticancer Research* 27, 3293–3299.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. *Am J. Clin Nutr.* 2004 79:727-747.
- Maria Luisa Sotti; Maria Teresa della Beffa, *Le piante aromatiche. Tutte le specie più diffuse in Italia*, Milano, Editoriale Giorgio Mondadori, 1989.
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, & Sakurai, H. ,1995, *Activeoxygen scavenging activity of plant extracts*. *Biological and Pharmacological Bulletin*, 18(1), 162–166.
- Medeiros L.R, Rosa, D.D, da Rosa, M.I, Bozzetti, M.C, Zanini, R.R, Oct 2009, "Efficacy of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review." *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*,

1166–76.

- Menghini L, Massarelli P, Bruni G, Meghini A. "Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of *Sideritis syriaca* L. herba extracts" .J Med Food 2005 Summer;8(2):227-31.
- Mimica-dukic N, Bozin B. *Mentha L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary , metabolites. , Curr Pharm Des, 2008, 14(29):3141-50.*
- Mirvish SS. *Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Inhibition of tumor induction and development. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, 1981.*
- Miura, K; Kikuzaki, H; Nakayami, N (2001) *Apianane terpenoids from Salvia officinalis. Phytochemistry 58:1171-1175.*
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". *N. Engl. J. Med.*, 518–27.
- Nanda, Rita (2006-06-09) "Cervical cancer", *MedlinePlus Medical Encyclopedia*, national institute of health.
- Ozen, H.C., Toker, Z., Ertekin, A.S., 2004. *Essential oil composition of two Salvia species from Turkey. AFS, Advances in Food Sciences 26, 32–34.*
- Papanikolaou K, Kokkini S. 1982. *A taxonomic version of Sideritis L. section Empedoclia (Rafin.) Bentham (Labiatae) in Greece. In Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects. Martinus Nijhoff: The Hague, 101–128.*
- Papanikolaou K, Kokkini S. 1984. *A thin-layer chromatographic study of some chemical leaf constituents in Sideritis L, sect Empedoclia (Rafin) Bentham (Labiatae) in Greece, Feddes Reperorium 95(5-6):359-368,1984.*
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegga, E., & Conte, L.S. (2002). *Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. intercedens) extracts related to*

- their phenolic compound content*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 1645–1651.
- Potter VR : A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver, 1981, Carcinogenesis, 2: 1375-1379.
  - Quattrocchi, Umberto, 1999, *CRC World dictionary of plant names: Common names, Scientific Names, Eponyms, Sonyonyms, and Etymology*, CRC Press.
  - Raal, A., Orav, A., Arak, E., 2007. *Composition of the essential oil of Salvia officinalis L. from various European countries*. Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis 21, 406–411.
  - Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM (April 2009). "A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification". BioTechniques, 277–84.
  - Raymond M. Harley, Sandy Atkins, Andrey L. Budantsev, Philip D. Cantino, Barry J. Conn, Renée J. Grayer, Madeline M. Harley, Rogier P.J. de Kok, Tatyana V. Krestovskaja, Ramón Morales, Alan J. Paton, and P. Olof Ryding. 2004. "*Labiatae*" pages 167-275. In: Klaus Kubitzki (editor) and Joachim W. Kadereit (volume editor). The Families and Genera of Vascular Plants volume VII. Springer-Verlag: Berlin; Heidelberg, Germany. ISBN 978-3-540-40593-1
  - Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. *Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development*. Cancer Res. 1987 47:5340-5346.
  - Rubin MM. Antenatal exposure to DES: lessons learned... future concerns. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2007, 62:548–555.
  - Ryu, S.Y., Lee, C.O., Choi, S.U., 1997. *In vitro cytotoxicity of tanshinones from Salvia miltiorrhiza*. Planta Medica 63, 339–342.
  - Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. *Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin*. Arch Biochem Biophys. 1990 283:107-113.
  - Samaras, G., S.P. Chatzopoulou, H.A. Goliaris, D. Mitsogiannis, and S.

- Galanopoulou-Sendouca. 2002. *The effect of the altitude on the yield and quality of the essential oil from greek mountain tea. Presented at 2nd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeastern European Countries*, Chalkidiki, Greece, 29 Sept.-3 Oct., 2002.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2005;45(4):287-306.
  - Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (May 1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix», *I. Exp. Med*, 695-710.
  - Sefidkon, F., Hooshidary, F., Jamzad, Z., 2007. *Chemical variation in the essential oil of Salvia bracteata Banks & Soland from Iran*. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 10: 265–272
  - S. Sertel, T. Eichhorn, P.K. Plinkert and T. Efferth, Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1), 2011, DOI 10.1007/s00106-011-2274-3
  - Sezik E. & Yesilada, E. (1999). *Essential oils*. In N. Krimer, & A. Mat (Eds.), Honour of Prof. Dr. K. H. C. Baser on his 50th birthday (pp. 98). Turkey: Eskisehir.
  - Shahidi F, Naczki M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.
  - Shereiqi I, Reddy P, Brenner DE. *Chemoprevention: general perspective*. Crit Rev Oncol Hem, 33: 157-167, 2000.
  - Shukla Y., Kumar Pal.S. Dietary cancer chemoprevention: An overview. *Inter J Jum Gen*, 4: 265-276, 2004.
  - Simon JE, AF Chadwick and LE Craker. 1984. *Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. Archon Books, 770 pp., Hamden, CT.
  - Skoula M, Abbes J, Johnson C. *Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of Salvia fruticosa mill growing in Crete*. Biochemical Systematics and Ecology, 28:551-561, 2000.

- Smith JJ, Tully P, Padberg RM. *Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy*. Sem Oncol Nurs, 21: 243-251, 2005.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)*. Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.
- Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L. and Kouretas D., Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, Food and Chemical Toxicology, 2012
- Strid A, Tan K. 1991. *Mountain Flora of Greece*. Edinburgh University Press: Edinburgh, Vol. II, 84–91.
- Surch Y-J. *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*. Nat Rev Cancer, 3:768–80, 2003.
- Sutton John (2004). *The Gardener's Guide to Growing Salvias*. Workman Publishing Company. p. 17. ISBN 978-0-88192-671-2.
- Tadic VM., 2012, "Anti-inflammatory, Gastroprotective, and Cytotoxic Effects of Sideritis scardica Extracts", Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić", Belgrade- Serbia, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden*. J Sci Food Agric. 2000 80:1073–1080.
- Trosko JE. Dietary modulation of the multistage, multimechanisms of human carcinogenesis: effects on initiated stem cells and cell-cell communication. *Nutr Cancer*, 2006.
- Trosko JE and Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, Toxicol Lett, 49:283-295.
- Trosko JE, Chang CC and Medkalf A: Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, 1983, Cancer Invest, 1:511-526.
- Tutin TG, Heywood VH, Burgess NA et al, 1972. *Flora Europea*. Cambridge University Press: Cambridge, Vol. 3, 138.



- Wainfain E, Poirier A: Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) *Cancer Res*, 52: 2071-2077.
- Waknine, Yael, October 2, 2006, "International Approvals: Singulair and Gardasil/ Silgard, *Medscape Today*.
- Wang, H., Helliwell, K., You, X., *Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC*, *Food Chem.* 2000, 68, 115 –121.
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45:1-8.
- Willis JC. 1966. *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns*, 7th edn. Cambridge University Press: Cambridge, 1038.
- Yinrong Lu and L. Yeap Foo (1999). *Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51:91-94.
- Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells (1991) *Carcinogenesis*,12:2109-2114.
- Zheng W, Wang S Y *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. *J Agric Food Chem* 2001 Nov. 49(11):5165-70.
- Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. *How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic*. *Nat Rev Cancer* 2:705-713, 2002.