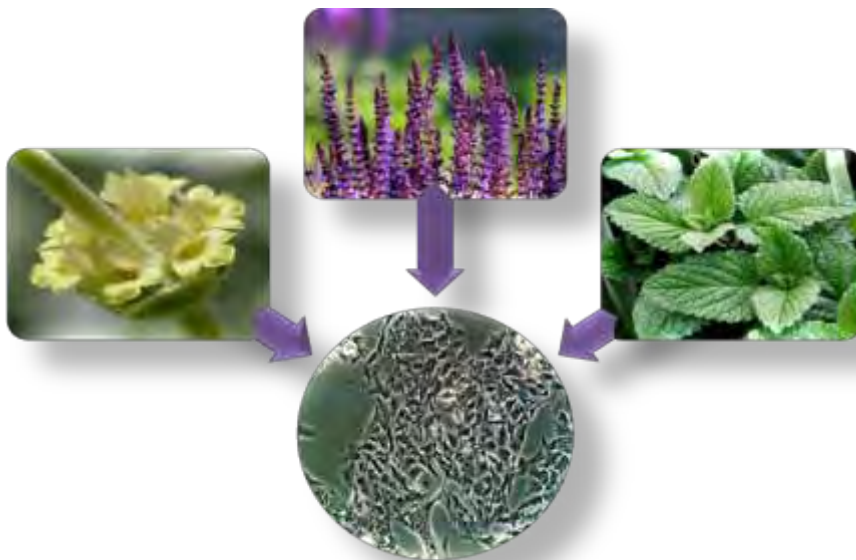




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΓΕΝΗ
SALVIA, *SIDERITIS* ΚΑΙ *MENTHA* ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ (HepG2)**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΚΑΡΑΓΚΙΝΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΓΕΝΗ
SALVIA, *SIDERITIS* ΚΑΙ *MENTHA* ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ (HepG2)**

**STUDY OF THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS OF THE GENERA
SALVIA, *SIDERITIS* AND *MENTHA* ON THE GROWTH OF LIVER
CANCER CELLS (HepG2)**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Αμούτζιας Γρηγόριος: Λέκτορας Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Σε όσους πίστεψαν σε μένα
δίνοντάς μου δύναμη και ώθηση για συνέχεια.*

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας με πρώτο τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Στάγκο Δημήτριο, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την ευκαιρία που με έδωσε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία, υποστήριξη και κατανόηση που μου παρείχε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο που μου επέτρεψε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο που διευθύνει μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον, καθώς επίσης και τον Λέκτορα κ. Αμούτζια Γρηγόριο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την εργαστηριακή ομάδα για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο και ιδιαίτερα το Θεοφάνη Μυλωνά, τον Αντώνη Ματάκο και τη Θάλεια Κερασιώτη για τη βοήθειά τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου για την αγάπη και την αμέριστη ψυχολογική στήριξη που μου προσφέρει σε κάθε μου βήμα, και ιδιαίτερα το θείο μου Νίκο για τη συμπαράσταση και την καθοδήγηση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Ο καρκίνος είναι ένα από τα συχνότερα και σοβαρότερα νοσήματα που αντιμετωπίζει η κλινική ιατρική. Φαίνεται ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Η εκδήλωση του καρκίνου, (όρος που αναφέρεται σε 150-200 διαφορετικές παθήσεις), οφείλεται ως επί το πλείστον σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε κάποιο ποσοστό όμως έχει και γενετική βάση με την έννοια της προδιάθεσης ορισμένων ατόμων για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου.

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισής του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ανάμεσα στους κύριους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες συγκαταλέγονται και οι πολυφαινόλες. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση 17 φυτικών εκχυλισμάτων, από τα γένη *Salvia* (φασκόμηλο), *Sideritis* (τσάι του βουνού) και *Mentha* (μέντα), στην αύξηση καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG2), 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 υπάρχει για τα καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας (Hela), ενώ άλλες σχετίζονται με τη μελέτη άλλων ειδών και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 κυττάρων με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 240 έως 1045 μg/mL. Ισχυρότερη δράση παρουσίασαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα από *Salvia officinalis*, *Salvia pomifera calycina* και *Salvia pomifera pomifera* με IC₅₀=240, 325 και 396 μg/mL αντίστοιχα. Συνεπώς, τα παραπάνω εκχυλίσματα υποδηλώνουν μια πιθανή χημειοπροφυλακτική δράση, ενώ χαρακτηρίζονται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες.

Περιεχόμενα

Περίληψη	05
Περιεχόμενα	06
Περιεχόμενα Εικόνων	08
Περιεχόμενα Πινάκων	09
Περιεχόμενα Γραφημάτων	09

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1. Γενικά	11
1.1.2. Καρκινογένεση	12
1.1.3. Η θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης	14
1.1.4. Καρκίνος του ήπατος	16
1.1.4.1. Κυτταρική σειρά HepG2	20

1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

1.2.1. Γενικά	21
1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	22

1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.3.1. Γενικά	28
1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών	29
1.3.2.1. Φλαβονοειδή	31
1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή	34
1.3.3. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών	35

1.4. ΧΕΙΛΑΝΘΗ

1.4.1. Η οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae)	40
--	----

1.4.2. Φασκόμηλο (<i>Salvia spp.</i>)	
1.4.2.1. Βοτανικά στοιχεία	41
1.4.2.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	46
1.4.3. Τσάι του βουνού (<i>Sideritis spp.</i>)	
1.4.3.1. Βοτανικά στοιχεία	50
1.4.3.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	53
1.4.4. Μέντα (<i>Mentha spp.</i>)	
1.4.4.1. Βοτανικά στοιχεία	55
1.4.4.2. Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία	57
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	59
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
2.1. ΥΛΙΚΑ	
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	60
2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	60
2.1.3. Εκχυλίσματα	61
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2	62
2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ	62
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	62
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	63
2.2.3. Στατιστική ανάλυση	64
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	65
<u>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	79
<u>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	84

Περιεγόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Εικόνα 2: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στο ήπαρ 50χρονης γυναίκας που είχε διαγνωστεί θετική σε ηπατίτιδα C. Δείγμα αυτοψίας.

Εικόνα 3: Παγκόσμιως χάρτης τυποποιημένης ηλικίας θανάτου από HCC ανά 100.000 κατοίκους το 2004

Εικόνα 4: Μορφολογική σύγκριση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 (B)

Εικόνα 5: Οι δύο κυριότεροι τρόποι για την παραγωγή φαινολικών συστατικών στα φυτά (βιοσυνθετικοί οδοί σικιμικού και οξικού οξέος)

Εικόνα 6: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

Εικόνα 7: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

Εικόνα 8: Χημικές δομές φλαβονοειδών

Εικόνα 9: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών

Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις διαιτητικών πολυφαινολών

Εικόνα 11: Μηχανισμοί παρεμπόδισης καρκινογένεσης από διαιτητικές πολυφαινόλες

Εικόνα 52: Φυτό του γένους *Salvia officinalis*

Εικόνα 13: Φυτό του γένους *Salvia fruticosa/tribola*

Εικόνα 14: Φυτό του γένους *Salvia Pomifera*

Εικόνα 15: Φυτό του γένους *Salvia sclarea*

Εικόνα 16: Φυτό του γένους *Sideritis clandestine*

Εικόνα 17: Φυτό του γένους *Sideritis raeseri*

Εικόνα 18: Φυτό του γένους *Sideritis scardica*

Εικόνα 19: Φυτό του γένους *Mentha pulengium*

Εικόνα 20: Φυτό του γένους *Mentha longifolia*

Εικόνα 21: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

Εικόνα 22: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer και καλυπτρίδες
β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* και το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (TPC) (Stagos et al, 2012).

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa*

Γράφημα 2: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*

Γράφημα 3: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*

Γράφημα 4: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calycina*

Γράφημα 5: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calycina*

Γράφημα 6: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*

Γράφημα 7: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*

Γράφημα 8: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*

Γράφημα 9: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*

Γράφημα 10: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestine*

Γράφημα 11: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloponnesiaca*

Γράφημα 12: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloropnesiaca*

Γράφημα 13: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*

Γράφημα 14: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*

Γράφημα 15: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*

Γράφημα 16: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Mentha longifolia*

Γράφημα 17: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Mentha pulengium pulengium*

Γράφημα 18: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50} .

Γράφημα 19: Συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC_{50} και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1 Γενικά

Ο καρκίνος είναι ένα από τα πιο συχνά και σοβαρότερα νοσήματα που αντιμετωπίζει η κλινική ιατρική. Αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Από τις στατιστικές προκύπτει ότι ορισμένες μορφές καρκίνου προσβάλλουν περισσότερο από το 1/3 του πληθυσμού και ευθύνονται για περισσότερο από το 20% του συνολικού αριθμού των θανάτων και στις αναπτυγμένες χώρες, για περισσότερο από το 10% του συνολικού κόστους της ιατρικής περίθαλψης. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Εάν δεν αντιμετωπισθεί ο καρκίνος, χωρίς εξαιρέσεις, οδηγεί στο θάνατο. Η πρόωπη διάγνωση και η αντιμετώπιση σε πρώιμα στάδια είναι ζωτικής σημασίας. Επίσης, η ταυτοποίηση ατόμων που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να προσβληθούν από καρκίνο, πριν την εμφάνιση του νοσήματος, αποτελεί σημαντικό αντικείμενο της έρευνας για τον καρκίνο.

Οργανικά, ο καρκίνος είναι μία ασθένεια των κυττάρων, παρόλα αυτά δεν είναι ένα και μόνο νόσημα. Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις πιο κακοήθεις μορφές νεοπλασίας, μιας παθολογικής διαδικασίας που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων, που ήταν φυσιολογικά μέχρι τη στιγμή της έναρξης της διαδικασίας καρκινογένεσης, ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυτταρικής μάζας ή όγκου (νεόπλασμα). Για το χαρακτηρισμό, όμως ενός νεοπλασματος ως καρκίνου, είναι απαραίτητο το νεόπλασμα να είναι κακοήθες, δηλαδή η αύξησή του να είναι ανεξέλεγκτη ή/και ο όγκος να μπορεί να εισβάλλει στους γειτονικούς ιστούς και να διασπείρεται σε πιο απομακρυσμένες θέσεις (μεταστατικός) (Thompson & Thompson, 2011).

Οι όγκοι που δεν είναι διηθητικοί ή μεταστατικοί δεν χαρακτηρίζονται ως καρκινικοί, αλλά ως καλοήθεις, παρόλο που το μέγεθος ή η θέση τους στο σώμα μπορεί να προκαλούν σημαντικά προβλήματα στον ασθενή. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές καρκίνου:

1. Τα σαρκώματα, στα οποία ο όγκος προέρχεται από μεσεγχυματικό ιστό (όπως τα οστά και οι μύες), από συνδετικό ή από νευρικό ιστό.

2. Τα καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακό ιστό, όπως τα κύτταρα που επενδύουν το έντερο, τους βρόγχους και τους μαστικούς αγωγούς και
3. Οι αιμοποιητικές και λεμφοειδείς κακοήθειες νεοπλασίες όπως η λευχαιμία και το λέμφωμα, που διασπείρονται μέσω του μυελού των οστών, το λεμφικό σύστημα και το περιφερικό αίμα (Thompson & Thompson, 2011).

Σε κάθε μία από αυτές τις μορφές, οι όγκοι ταξινομούνται περαιτέρω βάσει της θέσης που εμφανίζονται, του τύπου του ιστού και του βαθμού της κακοήθειας. Ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησής τους από τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, διακρίνονται σε ανώτερης, μέσης, κατώτερης διαφοροποίησης και σε αναπλαστικούς όγκους, όταν η διαφοροποίηση έχει χαθεί και σημειώνεται ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και των πυρήνων τους. Όσο περισσότερο αδιαφοροποίητος είναι ένας όγκος, τόσο αυξάνεται η επιθετικότητά του.

Οι καλοήθεις όγκοι συνήθως, περιβάλλονται από κάψα, παραμένουν εντοπισμένοι και χαρακτηρίζονται ως ανώτερης διαφοροποίησης χωρίς να προκαλούν απειλητικά για τη ζωή προβλήματα. Οι καλοήθεις όγκοι του καλυπτήριου επιθηλίου ονομάζονται θηλώματα, του αδενικού επιθηλίου αδενώματα και οι κυστικοί όγκοι κυσταδενώματα. Ένας καλοήθης όγκος μπορεί να εξαλλαχθεί σε κακοήγη σε κάποιες περιπτώσεις. Οι κακοήθεις όγκοι έχουν ένα ταχύ δυναμικό ανάπτυξης, μπορούν να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς και να δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις με αποτέλεσμα η μη έγκαιρη αντιμετώπισή τους να προκαλεί το θάνατο. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους (80%) είναι επιθηλιακής προέλευσης, στερεοί όγκοι. Το 10% προέρχονται από λεμφικό ή αιμοποιητικό ιστό (λεμφώματα ή λευχαιμίες αντίστοιχα), ενώ υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό όγκων νευροενδοκρινούς προέλευσης.

1.1.2 Καρκινογένεση

Η νεοπλασία ή αλλιώς καρκινογένεση είναι μια ανώμαλη συσσώρευση κυττάρων που οφείλεται σε ανισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της φθοράς των κυττάρων. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται καθώς διανύουν τον κυτταρικό κύκλο και υπόκεινται σε μίτωση. Η φθορά, λόγω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου απομακρύνει κύτταρα από τους ιστούς.

Αναλυτικότερα, ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από κύτταρα, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Φυσιολογικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται, ώστε να προκύψουν θυγατρικά κύτταρα και να διατηρηθεί η υγεία του οργανισμού. Στα πρώτα χρόνια της ζωής, και μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου, ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι έντονος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαιρούνται μόνο για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν φθαρεί ή πεθάνει. Μερικές φορές, η διαδικασία αυτή εκτρέπεται από το φυσιολογικό, οπότε προκύπτουν νέα κύτταρα, που ο οργανισμός δεν χρειάζεται, ενώ παράλληλα τα παλιά κύτταρα δεν πεθαίνουν. Τα πλεονάζοντα κύτταρα σχηματίζουν μάζες, που καλούνται όγκοι. Σε μερικές περιπτώσεις τα παθολογικά αυτά κύτταρα κάνουν μετάσταση, δηλαδή εξαπλώνονται και σε άλλα μέρη του σώματος δημιουργώντας δευτερεύοντες όγκους (μεταστατικούς όγκους) παρόμοιους με αυτούς του αρχικού καρκίνου.

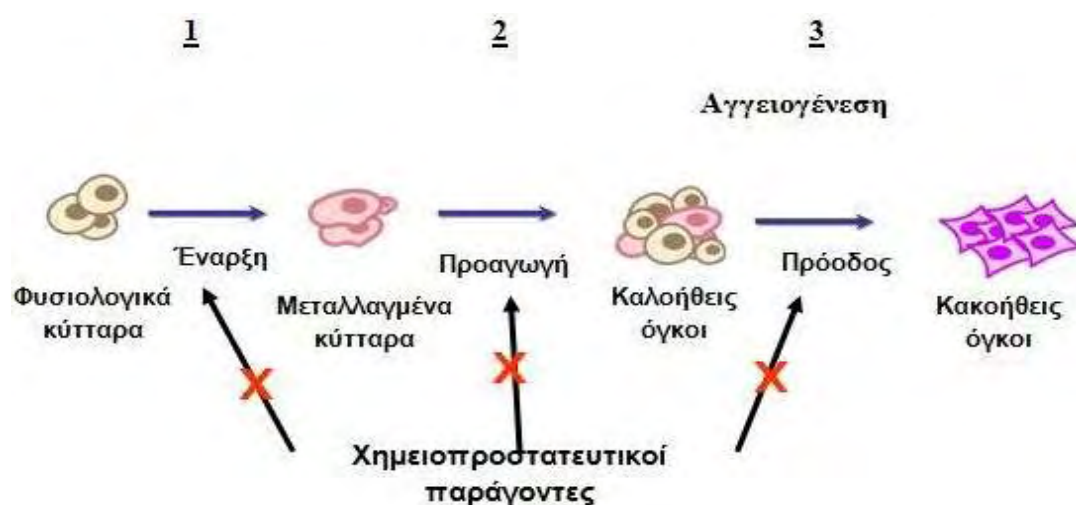
Η καρκινογενετική διαδικασία προϋποθέτει βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Τρεις βασικές κατηγορίες βλαπτικών παραγόντων ξεχωρίζουν: χημικές ουσίες, ακτινοβολία και ογκογόνοι ιοί (Ames B.N. et al, 1995). Κατά την πλειονότητά της (>70%) η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (καρκινογόνα μόρια στα τρόφιμα και την ατμόσφαιρα, δίαιτα, κάπνισμα κ.α.), σε ένα ποσοστό όμως, όπως προαναφέρθηκε, παραμένει γενετικό νόσημα, όχι με την αυστηρή έννοια του όρου αλλά ως μεγαλύτερη προδιάθεση ορισμένων ομάδων πληθυσμού για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (Σκορίλας Α., 2008). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τη μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό, συνήθως επιδρούν περισσότεροι από έναν βλαπτικοί παράγοντες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, σε συνδυασμό ή διαδοχικά (Κουρέτας Δ., 2003).

Αρκετές εναλλακτικές θεωρίες καρκινογένεσης, ωστόσο, βασίζονται σε επιστημονικές αποδείξεις και αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο. Έτσι μερικοί επιστήμονες πιστεύουν ότι ο καρκίνος μπορεί να προέρχεται από επιγενετικές αλλαγές (κληρονομικές και αντιστρεπτές αλλαγές εκτός της αλληλουχίας του DNA), (Jaffe LF, 2003) ή ανευπλοειδία (αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες σε χρωμοσώματα), (Rasnick D, Duesberg PH., 1999), περισσότερο από ότι από μεταλλάξεις. Ο καρκίνος έχει επιπλέον θεωρηθεί ως μεταβολική ασθένεια κατά την οποία επισυμβαίνει εκτροπή του μονοπατιού παραγωγής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αερόβια γλυκόλυση και την παραγωγή

ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλούν οξειδωτικό στρες (López-Lázaro M., 2010). Οι τελευταίες αυτές θεωρίες θεωρούνται πλέον ως συμπληρωματικές των κλασικών.

1.1.3 Θεωρία του πολυδιάστατου μοντέλου 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). Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται να περιλαμβάνει την ανάπτυξη διάφορων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση (Fika V, 1986), την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού (Loewenstein WR., 1979) ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ' επαφής, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα (Kanno Y., 1985) και την ικανότητα να διηθεί και να μεθίσταται (Nicolson GL., 1987). Η καρκινική μάζα είναι μονοκλωνικής προέλευσης, από ένα αρχικά εξαλλαγμένο καρκινικό κύτταρο (Fialkow PJ., 1979). Ωστόσο, ο κλωνικός πολλαπλασιασμός κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής καρκινογενετικής διαδικασίας, προκαλεί την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών φαινοτύπων μέσα στον όγκο, πιθανότατα μέσω επιπλέον γενετικών ή επιγενετικών αλλοιώσεων (Kerbel RS. et al, 1984). Σύμφωνα με τη θεωρία του πολυσταδιακού αυτού μοντέλου, η καρκινογένεση φαίνεται να διαιρείται σε τρία βασικά στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς :



Εικόνα 6: Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων

1.Εναρξης (initiation) :

Το πρώτο αυτό στάδιο περιλαμβάνει την πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγεννήτορα (stem cell) (Potter VR.,1981), υπό την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Ο παράγοντας πιθανότατα στοχεύει σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση. Συνέπεια της μετάλλαξης αυτής είναι η γέννηση ενός κυττάρου με ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ενός κυττάρου, που υπό τις κατάλληλες συνθήκες εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων (Trosko JE., Chang CC 1989), από ό,τι θα έκανε φυσιολογικά.

2.Προαγωγής (promotion):

Το δεύτερο στάδιο διέπεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων (promoters) που προάγουν τη μίτωση (Trosko JE. et al., 1989). Καθώς το μνημένο κύτταρο (initiated) συνεχίζει να διαιρείται υπερβαίνοντας τον φυσιολογικά προκαθορισμένο αριθμό διαιρέσεών του, στα κύτταρα απογόνους του προστίθενται ραγδαίες γενωμικές βλάβες που αυξάνουν δραματικά τη γενωμική αστάθεια. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη, η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο. Πρέπει να σημειωθεί ότι το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απόσυρση του προαγωγέα (Κουρέτας Δ., 2003).

3.Προόδου (Progression):

Στο στάδιο αυτό, γίνεται μετατροπή του μεταλλαγμένου και εξαρτώμενου από τον προαγωγέα κυττάρου, σε ένα καρκινικό, ανεξάρτητο από προαγωγέα κύτταρο. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή δράση του προαγωγέα, σε κάποιο κύτταρο, παρατηρείται η εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο (Hennings H. et al, 1983). Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι για την καρκινική εξαλλαγή είναι απαραίτητες τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες, ενώ αρκετές ενδείξεις οδηγούν στο ότι η δεύτερη βλάβη σχετίζεται με απάλειψη αντιογκογονιδίων (Koufos A. et al,1985). Βέβαια, φαίνεται ότι στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες .

Συχνά, οι φάσεις της προαγωγής-προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση που ίσως τελικά να είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα (Marx J., 1989).

1.1.4 Καρκίνος του ήπατος

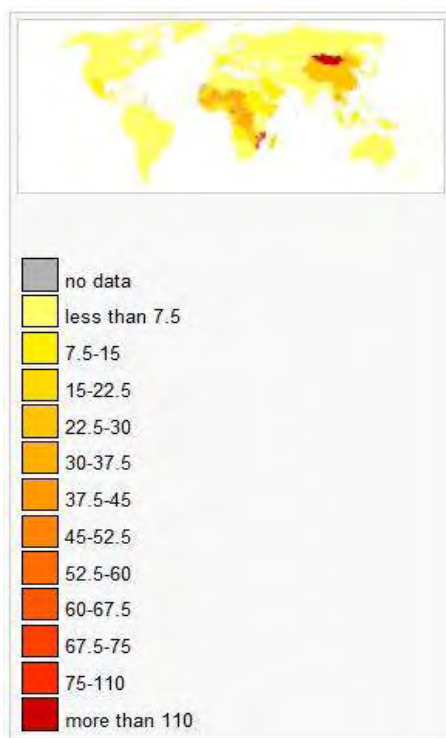


Εικόνα 7: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στο ήπαρ 50χρονης γυναίκας που είχε διαγνωστεί θετική σε ηπατίτιδα C. Δείγμα αυτοψίας.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC, που ονομάζεται επίσης κακοήθες ηπάτωμα) ή αλλιώς πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος είναι ένας από τους πιο συχνούς όγκους, που αντιπροσωπεύει την πιο συχνή κακοήθεια σε όλο τον κόσμο και την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο (Parkin, 2001). Οι

περισσότερες περιπτώσεις HCC είναι δευτερεύουσες. Σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν σε HCC είναι οι χρόνιες μολύνσεις από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) ή της ηπατίτιδας C (HCV) (25% των αιτιών παγκοσμίως) (Alter MJ, 2007), η παρατεταμένη έκθεση σε μερικούς διατροφικούς καρκινογόνους παράγοντες, ιδίως σε αφλατοξίνη (Bosch, 1999, Pang, 2006), ο αλκοολισμός και, ενδεχομένως, η παχυσαρκία (Neuschwander-Tetri, 2003) και ο διαβήτης (El-Serag, 2004). Οι χρόνιες μολύνσεις της ηπατίτιδας Β &/ή C συμβάλλουν στην ανάπτυξη HCC προκαλώντας επανειλημμένα το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να επιτεθεί στα κύτταρα του ήπατος, μερικά από τα οποία μόνο έχουν μολυνθεί από τον ιό (Chien-Jen Chen, 2006). Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν κίρρωση διαφόρων αιτιολογιών, όπως αλκοολική κίρρωση και κίρρωση που συνδέεται με γενετικές ασθένειες του ήπατος και πρωτογενή αιμοχρωμάτωση (Pang, 2006, El-Serag, 2001). Ακόμη, η νόσος του Wilson, σύμφωνα με την υπόθεση μερικών, αυξάνει τους κινδύνους εμφάνισης του HCC (Wang et al, 2002), αν και οι περιπτωσιολογικές μελέτες είναι σπάνιες (Cheng W. et al, 1992) και δείχνουν το αντίθετο, όπου η νόσος του Wilson στην πραγματικότητα μπορεί να παρέχει προστασία έναντι αυτού (Wilkinson et al, 1983). Έτσι, ο HCC εκδηλώνεται σε περιοχές με υψηλή συχνότητα εμφάνισης του HBV (π.χ. Νοτιοανατολική Ασία και υπο-σαχάρια Αφρική) και HCV (π.χ. Νότια Ευρώπη) (Nordenstedt, 2010). Στη Βόρεια Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες πρωταρχική αιτία του HCC είναι η

αλκοολική ηπατοπάθεια και ο HCV (El-Seraq, 2001, Bosch, 2005, Mischlielsen, 2005).



Εικόνα 8: Παγκόσμιος χάρτης τυποποιημένης ηλικίας θανάτου από HCC ανά 100.000 κατοίκους το 2004. (Vente MA., 2009)

Τα συμπτώματα του HCC περιλαμβάνουν την εμφάνιση ίκτερου, φουσκώματος από ασκίτιδα, εύκολων μελανιασμάτων, ανωμαλιών θρόμβωσης του αίματος ή ως απώλεια βάρους, κοιλιακούς πόνους ειδικά στο ανώτερο δεξί τεταρτημόριο, ναυτία, εμετό ή κόπωση.

Οι θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με HCC περιλαμβάνουν την χειρουργική εκτομή (Takayama, 1998) και τη μεταμόσχευση ήπατος, οι οποίες ισχύουν μόνο για ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με πρώιμους όγκους (Poop, 2004). Άλλες θεραπείες που χρησιμοποιούνται, κυρίως για την ανακούφιση των πασχόντων (Poop, 2002) από HCC, είναι η διαδερμική έγχυση αιθανόλης (Ebara 1990), η διαδερμική καυτηρίαση με ραδιοσυχνότητες (Curley, 2000) και με καθετήρα αρτηριακό εμβολισμό (Ikeda, 1991). Όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, μέχρι στιγμής, το μόνο φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του HCC είναι το sorafenib, αλλά το κέρδος για επιβίωση είναι μέτριο (Horgan, 2010).

Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους οι ασθενείς με HCC έχουν κακή πρόγνωση είναι η πολυκεντρική εμφάνιση του HCC στο ήπαρ των ασθενών

με χρόνια ηπατίτιδα ή η κίρρωση που προκαλείται κυρίως από λοίμωξη HBV ή HCV (Yamamoto, 1999). Έτσι, ακόμη και αν ο πρώτος καρκίνος διαγνωστεί και απομακρυνθεί, ένας άλλος παθολογικός κυτταρικός κλώνος μπορεί να προκύψει για να σχηματιστεί ένας δεύτερος πρωτοπαθής καρκίνος (Moriwaki, 2002). Επιπλέον, μπορεί να υπάρξει υποτροπιασμός σε ασθενείς με HCC που οφείλεται σε ενδοηπατική μετάσταση, δηλαδή την εμφάνιση ενός κυτταρικού κλώνου που προέρχεται από τη μετατροπή αρχικού κλώνου κυττάρων (Chen, 2000). Η συχνότητα του περιοδικού αυτού καρκίνου του ήπατος εκτιμάται ότι είναι κατά 20-25% ετησίως. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος για την κακή πρόγνωση του HCC είναι η επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας του HCC (Nagasue, 1999, Eguchi 2000). Ως εκ τούτου, λόγω του γεγονότος ότι οι τρέχουσες θεραπείες για HCC δεν είναι τόσο αποτελεσματικές, χρειάζονται νέες στρατηγικές για να εμποδίζουν την ανάπτυξη ή την μετά-θεραπευτική επανάληψη του HCC, αλλά και να μην συνεισφέρουν σε τυχόν επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας.

Η θεραπευτική τακτική εξαρτάται από:

- το μέγεθος του όγκου
- το στάδιο της νόσου (δηλαδή την έκταση της εξάπλωσής της)
- τη βιολογική ηλικία (όχι την πραγματική αλλά την ποιότητα της υγείας για τη δεδομένη ηλικία)
- την κατάσταση του ήπατος (πόσο καλά λειτουργεί)
- τη γενική κατάσταση του ασθενούς
- την παρουσία καψιδίου του όγκου
- την παρουσία εξωηπατικών μεταστάσεων
- την παρουσία θυγατρικών οξείδιων
- την αγγείωση του όγκου

Ο γιατρός, ο οποίος πρέπει να είναι εξειδικευμένος στο συγκεκριμένο αντικείμενο, μπορεί να συστήσει χειρουργική θεραπεία, χημειοθεραπεία (συστηματική, δηλαδή με ενδοφλέβια χρήση φαρμάκων που διαχέονται σε όλο το σώμα ή περιοχική, δηλαδή με χορήγηση φαρμάκων με ειδικό σύστημα από την ηπατική αρτηρία που εγχέονται απευθείας μόνο στο ήπαρ σε συνδυασμό ή όχι με εμβολισμό) ή ακτινοβολία και βιολογική θεραπεία (που ενισχύει τον οργανισμό στην καταπολέμηση της νόσου με τις ίδιες τις δυνάμεις του-αυτή λέγεται και ανοσοθεραπεία). Μπορεί να συστηθεί επίσης συνδυασμός δύο ή περισσότερων

από τις παραπάνω θεραπευτικές δυνατότητες. Γενικώς, ο καρκίνος του ήπατος αντιμετωπίζεται δύσκολα εκτός και εάν ο όγκος είναι σχετικά μικρός και εντοπίζεται στον ένα λοβό του ήπατος αλλά, στις περισσότερες περιπτώσεις, η διάγνωση της νόσου γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, όπου ο καρκίνος είναι ανεγχείρητος. Η χειρουργική θεραπεία, όταν ενδείκνυται, αποτελεί τη μόνη και πιο αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή που μπορεί να προσφέρει και μόνιμη θεραπεία. Η μεταμόσχευση του ήπατος εφαρμόστηκε κατά το παρελθόν αλλά αποδείχθηκε ότι συνήθως ο καρκίνος εμφανίζεται πάλι (υποτροπή) και σήμερα δεν συνιστάται. Όταν, η χειρουργική θεραπεία, όπως συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν έχει θέση στην αντιμετώπιση της νόσου, εφαρμόζοντας τις άλλες μορφές θεραπείας που είναι παρηγορικού τύπου (όχι θεραπευτικές), ο ασθενής μπορεί να ανακουφιστεί από τα συμπτώματά του και να του προσφερθεί καλύτερη ποιότητα ζωής ή και ακόμη να επιμηκυνθεί ο χρόνος επιβίωσής του.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί κάποιες στρατηγικές για την αποτροπή της ανάπτυξης του HCC. Μία από τις αποτελεσματικότερες στο γενικό πληθυσμό είναι ο εμβολιασμός κατά της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας. Για παράδειγμα, ο εμβολιασμός κατά του HBV μείωσε σημαντικά τη συχνότητα του HCC σε παιδιά στην Ταϊβάν (Chang, 1997). Ωστόσο, ο εμβολιασμός έναντι του HCV δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί, και έτσι άλλες μέθοδοι, όπως έλεγχος για HCV σε δωρεές αίματος, χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της μετάδοσης HCV μέσω μετάγγισης αίματος. Επιπλέον, η ιντερφερόνη έχει χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ήπατος με την εξάλειψη του HCV από ασθενείς με χρόνιες παθήσεις του ήπατος (Kasahara, 1998, Camma, 2001). Άλλες στρατηγικές πρόληψης ενάντια στον HCC είναι η μείωση της έκθεσης στην αφλατοξίνη. Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη *Aspergillus*, και βρέθηκαν σε τρόφιμα, όπως καλαμπόκι και φρούτα, ιδιαίτερα υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας. Στις περιοχές, όπου η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με αφλατοξίνη είναι κοινή, τα ποσοστά εμφάνισης HCC τείνουν να είναι υψηλά (Nordenstedt, 2010). Η έκθεση σε αφλατοξίνη μπορεί να μειωθεί με τη χρήση καλύτερων μεθόδων για τη συγκομιδή, αποθήκευση και επεξεργασία ευαίσθητων τροφίμων. Ωστόσο, η πλήρης εξάλειψη της μόλυνσης από αφλατοξίνες δεν θεωρείται πιθανή. Οι παραπάνω στρατηγικές πρόληψης ανήκουν στην πρωτογενή πρόληψη με στόχο το γενικό πληθυσμό ή άτομα με αυξημένο κίνδυνο για HCC. Για τη δευτερογενή πρόληψη κατά του HCC, η οποία στοχεύει

κυρίως σε ασθενείς είτε με προ-κακοήθεις αλλοιώσεις ή με υποτροπιάζοντες όγκους αλλά που είχαν λάβει θεραπεία κατά του καρκίνου για τον αρχικό όγκο, η χημειοπροφύλαξη μπορεί να είναι η πιο σημαντική στρατηγική. Χημειοπροφύλαξη ορίζεται ως η χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων για την αναστροφή, καταστολή ή την πρόληψη καρκινικής ανάπτυξης σε καρκίνο (Sporn & Liby, 2005). Πολλοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες είναι φυτοχημικές ουσίες, δηλαδή μη θρεπτικές χημικές ουσίες των φυτών που έχουν προστατευτικές ή ιδιότητες πρόληψης ασθενειών.

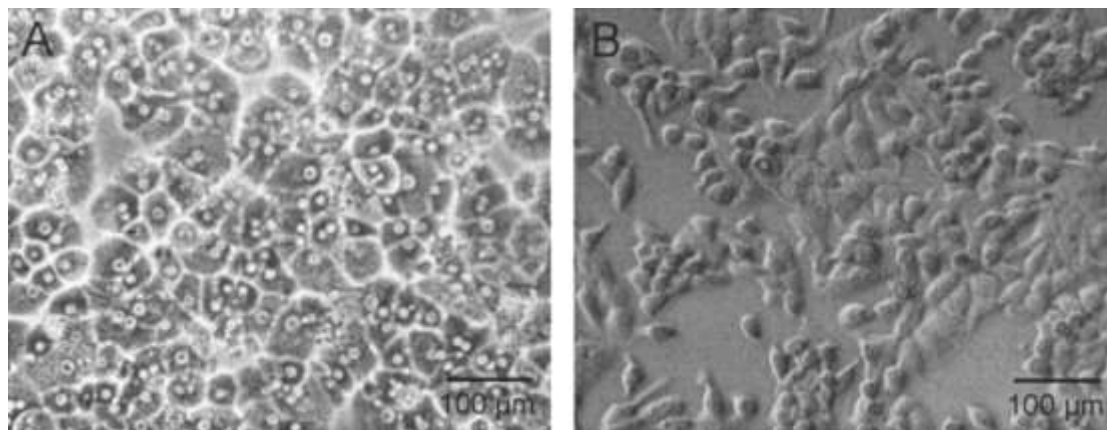
1.1.4.1 Κυτταρική σειρά HepG2

Τα HepG2 είναι προσκολλητικά κύτταρα, με μορφή που θυμίζει κύτταρα επιθηλιακά. Αναπτύσσονται ως μονοστιβάδες και σχηματίζουν μικρά συσσωματώματα. Η HepG2 κυτταρική σειρά είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά, που προέρχεται από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού αγοριού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, α-2-μακροσφαιρίνη, πλασμινογόνο. Τα HepG2 αποκρίνονται σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (HGH).

Με τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα HepG2 εμφανίζουν ισχυρή μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση με ένα ελεγχόμενο σχηματισμό των κορυφαίων και βασεοπλευρικών τομέων κυτταρικής επιφάνειας (Van IJzendoorn et al, 1997,. 2000), που μοιάζουν με τους καναλιοειδείς (BC) και τους ημιτονοειδείς τομείς της χολής, αντίστοιχα, σε βιολογικό περιβάλλον.

Λόγω του υψηλού βαθμού μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης *in vitro*, τα κύτταρα HepG2 είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και της δυναμικής των καναλιών του χοληδόχου πόρου και των μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα *in vitro*. Αυτό μπορεί να είναι σημαντικό για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών του ήπατος που προκαλούνται από μία εσφαλμένη υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών επιφάνειας κυττάρου, π.χ. ελαττώματα στη λειτουργία των ηπατικών καναλιών- μεταφορέων, όπως στη νόσο Dubin-Johnson, (PFIC), και οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τα κύτταρα HepG2 και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται επίσης ως ένα σύστημα μοντέλου στη μελέτη του μεταβολισμού

του ήπατος και στην τοξικότητα ξενοβιοτικών, την ανίχνευση κυτταροπροστατευτικών και αντι-γενετοξικών παραγόντων, την κατανόηση της ηπατοκαρκινογένεσης, και για μελέτες στοχοθέτησης φαρμάκων. Τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται επίσης σε δοκιμές με βιο-τεχνητές συσκευές ήπατος.



Εικόνα 9: Μορφολογική σύγκριση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 (B). Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα εμφανίζουν το τυπικό κυβικό σχήμα, και τα HepG2 κύτταρα δείχνου μορφολογία παρόμοια με επιθηλιακά κύτταρα

1.2 ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

1.2.1 Γενικά

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, το κάπνισμα, η διατροφή και το εργασιακό περιβάλλον (ACS, 1995, De Flora & Ferguson, 2005). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν πως υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Γνωρίζοντας λοιπόν τους μοριακούς μηχανισμούς δημιουργίας του καρκίνου, προσπαθούμε να αναστείλουμε ή να εμποδίσουμε τα αρχικά στάδια (όπως την εισδοχή των καρκινογόνων ουσιών στα κύτταρα, την ενεργοποίηση των προκαρκινικών ουσιών σε καρκινικές, τον αχαλίνωτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων κλπ.), (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Σήμερα, μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου θεωρείται η χημειοπροστασία, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al., 2004; Surch, 2003). Ως χημειοπροφύλαξη ή

χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων (Sporn M.B et al, 1976; Hong & Sporn, 1997; Kelloff et al., 2004). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι χημειοπροφύλαξη και πρόληψη διαφέρουν. Η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή συνηθειών (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος). Αντίθετα, η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση χαπιών ή συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία περιέχουν τα υποτιθέμενα ενεργά συστατικά διατροφικών πηγών, όπως φρούτα και λαχανικά (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Η στρατηγική της 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) εξασφάλιση της χημειοπροστασίας με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Ανάμεσα στις τρεις άνωθεν προσεγγίσεις πολύ σημαντική θεωρείται η τελευταία, διότι οι δύο προηγούμενες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση (Shureiqi et al, 2000, Stoner et al., 1997).

1.2.2 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Απόλυτη ταξινόμηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων δεν είναι εφικτή. Κύρια αιτία αποτελεί το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης αρκετών ενώσεων παραμένει ακόμη άγνωστος. Επιπλέον, σύμφωνα με τον περισσότερο δραστικό μηχανισμό, η αυτή κατάταξη δυσχεραίνεται από το ότι πολλοί από τους παράγοντες φαίνεται να δρουν μέσω περισσότερων του ενός μηχανισμών (πλειοτροπική δράση) καθώς και αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως, είτε μεταξύ τους είτε με τους καρκινογόνους παράγοντες. Ακόμη, διάφοροι παράγοντες

όπως η συγκέντρωση, η βιοδιαθεσιμότητα, ο τρόπος εισαγωγής των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων στον οργανισμό επηρεάζουν έντονα αυτούς τους μηχανισμούς δράσης (De Flora & Ferguson, 2005, Kelloff et al., 2005).

Το 1985, ο Wattenberg επιχείρησε την πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων στηριζόμενος στα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών σε πειραματόζωα (Wattenberg, 1985). Στην πορεία των χρόνων, βέβαια, πολλές μελέτες έχουν εμπλουτίσει την αρχική τους ταξινόμηση (Kelloff et al., 2004, 2000, Shukla et al., 2004, De Flora et al., 2001). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τον Wattenberg, οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Η κατάταξη έχει ως εξής:

- i. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- ii. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.
- iii. Παράγοντες παρεμπόδισης ή καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγή και την πρόοδο της καρκινογένεσης.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, είναι πολλοί και κατατάσσονται τόσο στην πρόιμη όσο και στη μετέπειτα προστασία.

i.Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι παρεμποδιστές σχηματισμού των νιτροζαμίνων από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον (Stoner et al., 1997). Ειδικότερα, συναντούμε αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ), σουλφυδρυλικές ενώσεις (π.χ. Ν-ακετυλοκυστεΐνη) και διάφορα αμινοξέα (π.χ. προλίνη, θειοπρολίνη). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα στη συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς η βιταμίνη C, όπως είναι ευρύτερα γνωστή. Δρα ελαττώνοντας 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 και Shankel 1990, Κουρέτας 2003).

ii. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) δρουν κυρίως στο στάδιο της έναρξης (Κουρέτας Δ., 2003), αλλά και στο στάδιο της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, αναστέλλουν τη δράση γενοτοξικών παραγόντων, εξουδετερώνουν ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες και ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω, στη συγκεκριμένη κατάταξη προκύπτουν οι παρακάτω κατηγορίες παραγόντων παρεμπόδισης της δράσης των καρκινογόνων:

1. Αναστολείς του κυτοχρώματος P450. Τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών 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 θεωρούνται ότι μπορεί να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.

2. Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης 2 προτιμούνται σαν αντικαρκινικοί παράγοντες, μιας και δεν είναι πιθανό να δρουν από μόνοι τους σαν καρκινογόνοι παράγοντες. 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 (Κουρέτας Δ., 2003).

3. Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών. Βλάβες στο DNA των κυττάρων προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονιοφιλικών «τελικών» καρκινογόνων (μεταβολικά ενεργά καρκινογόνα) ή των διαφόρων ελευθέρων ριζών με το DNA. Συνεπώς η εξουδετέρωσή τους αποτελεί βασικό μηχανισμό χημειοπροφυλακτικής δράσης.

4. Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA. Πρόκειται για ένζυμα ή φυσικές ουσίες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στους μηχανισμούς αποκατάστασης βλαβών του DNA.

iii. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Η ταξινόμηση των παραγόντων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι πιο δύσκολη, γιατί τα κρίσιμα γεγονότα και η ακριβής αλληλουχία τους κατά την προαγωγική φάση και τη φάση της προόδου της καρκινογένεσης, δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Ωστόσο, όπως προτάθηκε από τους Morse και Stoner (Morse MA et al, 1993), τους DeFlora και Ramel (De Flora S. et al, 1990) και τους Kelloff και συνεργάτες (Kelloff GJ et al, 1994), οι περισσότερες από τις χημειοπροφυλακτικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας μπορεί να ταξινομηθούν σαν:

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

2. Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης. Η έλλειψη της κυτταρικής διαφοροποίησης αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι η αποκατάσταση της ικανότητας των κυττάρων προς διαφοροποίηση έχει τη δυνατότητα να καταστείλει την καρκινογένεση. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, 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 τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C, συμβάλλοντας έτσι σε καταστολή της καρκινογένεσης. (Kelloff GJ, 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 τη σύνδεση και προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan VC, 1992). Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν άμεσα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω ρύθμισης της επαγωγής ή της δραστηριότητας ειδικών ορμονών ή αυξητικών παραγόντων.

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 είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των

κυττάρων που συμβάλλουν στην επικοινωνία μεταξύ τους. Αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στους όγκους. Ουσίες όπως το ρετινοϊκό οξύ, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο που προάγουν τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση.(Zhang et al, 1991, Κουρέτας Δ, 2003).

7. Επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης. Υπάρχουν χημειοπροστατευτικοί παράγοντες που έχουν επαγωγικές δράσεις της ανοσολογικής απόκρισης. Σχετικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη Ε που σε κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων και το ρετινοϊκό οξύ που συμβάλλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers-NK).(Hill DL, Grubbs CJ. 1992).

8. Επαγωγείς της απόπτωσης Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών.(Νακοπούλου Α, 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. Χορηγείται για την αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας.(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.

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 οι πρωτεάσες (ελαστάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών σε κάποιο ποσοστό οφείλεται στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης.(Kennedy AR., 1998).

11. Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ανάμεσα στα άλλα που λαμβάνουν χώρα κατά τη φάση προαγωγής της καρκινογένεσης συμβαίνει και αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος που συμμετέχει στην 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 BS et al, 1987). Επιπροσθέτως αναστολείς της λιποξυγενάσης (π.χ. βιταμίνη E) αναστέλλουν την φάση προαγωγής της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών (Huang MT et al, 1991).

1.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

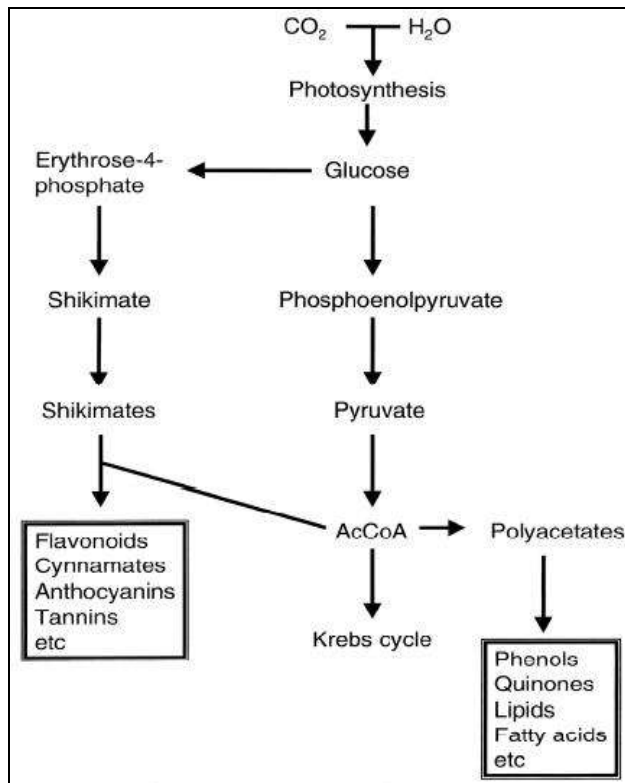
1.3.1 Γενικά

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 X, 2010). Είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harborne, 1993, Bravo, 1998). Αποτελούν τα κυριότερα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Έτσι, συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου, καθώς είναι πλούσιες στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα

ψυχανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν (Kris- Etherton PM et al, 2002). Γενικά στις πολυφαινόλες οφείλεται το χρώμα και γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων (στυφάδα, τραχύτητα) και το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών, καθώς σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al, 2004, Vermeris & Nicholson, 2006, Crozier et al, 2006). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα 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).

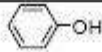

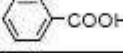
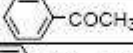
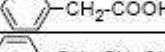
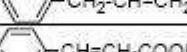
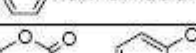
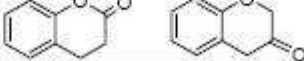
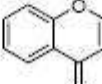
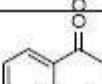
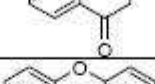
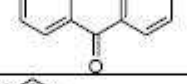
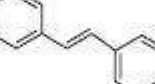
1.3.2 Χημική δομή-κατηγορίες πολυφαινολών

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Πρόκειται, είτε για απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005)



Εικόνα 5: Οι δύο κυριότεροι τρόποι για την παραγωγή φαινολικών συστατικών στα φυτά (βιοσυνθετικοί οδοί σικιμικού και οζικού οξέος)

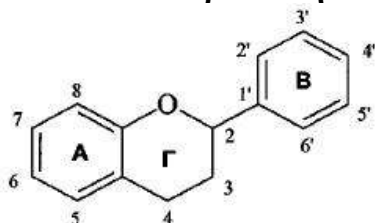
Στη φύση ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες, είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα τους μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων τους, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, παμνόξη, ξυλόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι επίσης ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Όσον αφορά τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, αφού άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Διακρίνονται τουλάχιστον σε 10 κατηγορίες (Harborne, 1989) ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους, δηλαδή ανάλογα του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους.

Απλές φαινόλες		Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, συριγγικό, βανιλικό (αλδεΐδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνά στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοειδή		
(Υδροξυ)καναμμοϊικά οξέα		Φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στίβενια		
Ανθρακινόνες		Εμοδίνη κλπ
Φλαβονοειδή		
Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες		

Εικόνα 6: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή, και τα μη-φλαβονοειδή.

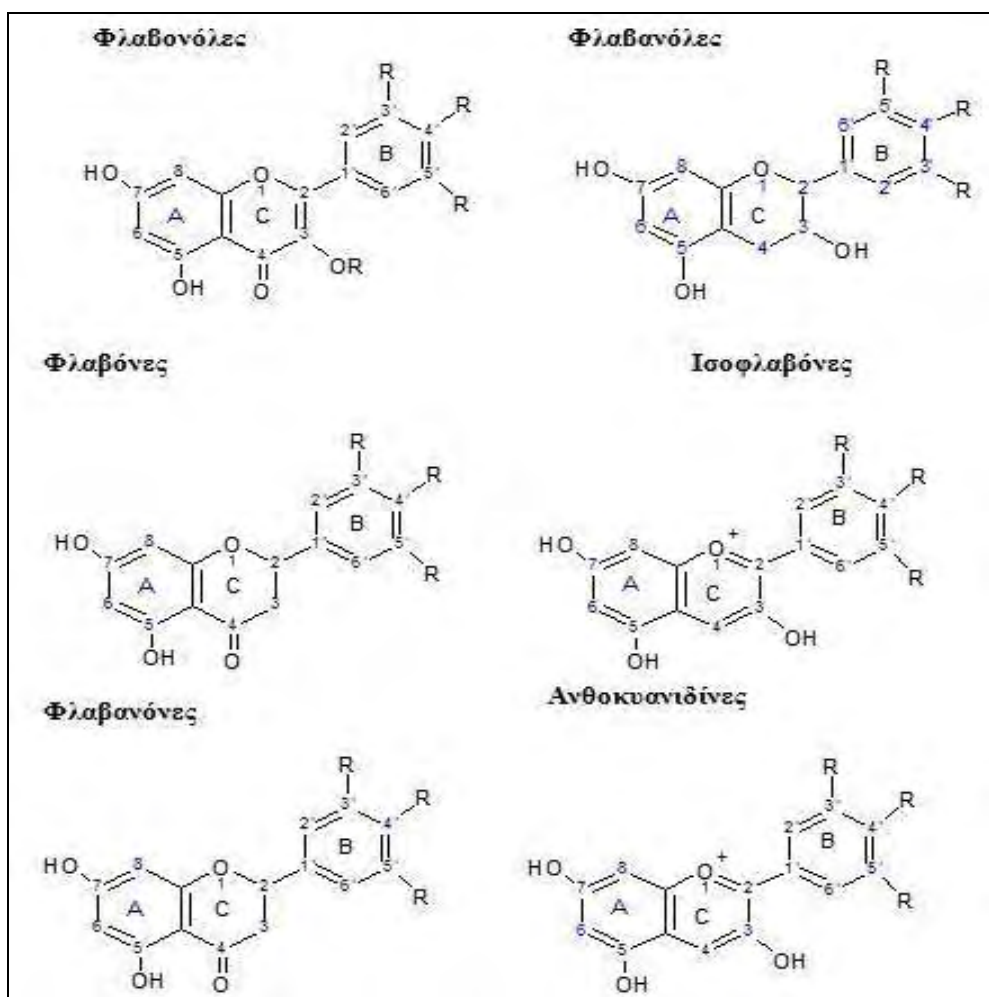
1.3.2.1 Φλαβονοειδή



Εικόνα 7: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα, αφού περιλαμβάνουν πάνω από 4000 αναγνωρισμένα στελέχη (Cheynier, 2005). Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Έχουν κοινή δομή, η οποία χαρακτηρίζεται από 2 βενζολικούς (αρωματικούς) δαχτυλίους (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δαχτυλίου, τριών

ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (Γ). Παρουσιάζουν δηλαδή τη δομή (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών λοιπόν περιέχει 15 άτομα άνθρακα. Έχουν σχετικά μικρά μοριακά βάρη και είναι γενικά ευδιάλυτα, ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (αριθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης, κλπ). Οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίστανται στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3-υδροξύ ή 2-οξύ ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτυλίους Α και Β (Vinson, 1998). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανιδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach C. et al, 2004).



Εικόνα 8: Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006)

Αναλυτικότερα:

Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Βρίσκονται 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 (Manach C, et al, 2004). Οι φλαβονόλες συνήθως βρίσκονται με τη γλυκοσιλιωμένη τους μορφή με τα συζευγμένα σάκχαρα να είναι κυρίως η γλυκόζη και η ραμνόζη. Κυριότερες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη και η καμπερόλη.

Φλαβόνες: βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά (σε γλυκοσιλιωμένη μορφή κυρίως) και στα εσπεριδοειδή (σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi F, Naczk M. 1995). Υπάρχουν κυρίως ως 7-O-γλυκοσίδια με κυριότερους εκπροσώπους τη λουτεολίνη και την απιγενίνη.

Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτοοιστρογόνου και την ικανότητα να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα τη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης. (Manach C. et al, 2004).

Φλαβανόνες: βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan FA, Clifford MN., 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριονκτικτόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες. (Manach C. et al, 2004).

Ανθοκυανιδίνες: βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαίτερος στα φρούτα. (Clifford MN. 2000). Εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και προσδίδουν το ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Κύρια εκπρόσωπος είναι η κυανιδίνη (Manach C. 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). Εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, αλλά σημαντικότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.

1.3.2.2 Μη Φλαβονοειδή

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

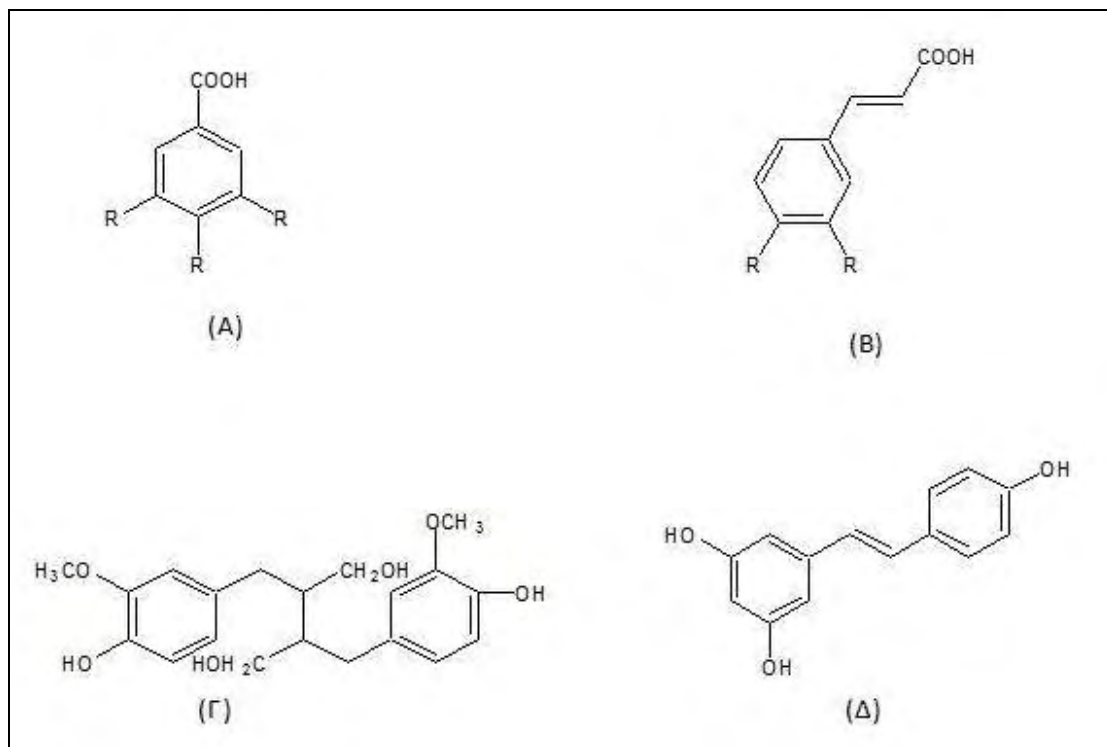
Φαινολικά οξέα: μπορούμε να τα διακρίνουμε στα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκιναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξαιρέση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών, όπως οι υδρολύμενες τανίνες (Clifford MN, Scalbert A., 2000). Χαρακτηριστικότερα βενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουνικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Είναι γνωστή η δράση του καφεϊκού οξέος, τόσο στην απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, όσο και στη δραστηριότητα της κασπάσης 3 από πολλές μελέτες. (Lee HJ et al., 2005).

Λιγνάνα: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. 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 και λαχανικά (Adlercreutz H, Mazur W., 1997).

Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. 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). Έχει μελετηθεί εκτενώς εξαιτίας της πιθανής αντικαρκινικής της δράσης.

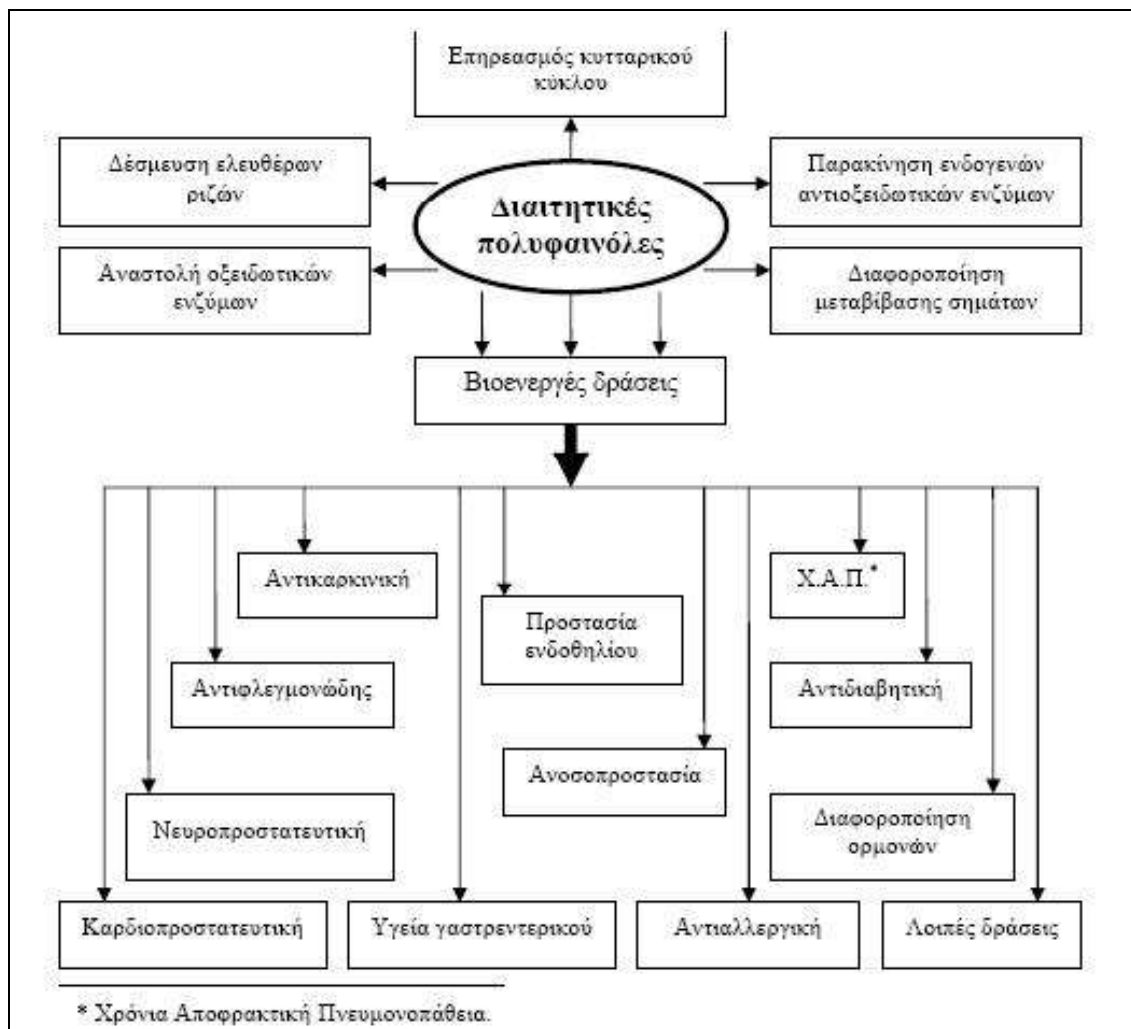


Εικόνα 9: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνάνων. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ). Σεκοΐσολαρισρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006)

1.3.3 Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών

Σε επίπεδο φυτικού οργανισμού, οι πολυφαινόλες θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύνοντας 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).

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες και για τον ανθρώπινο οργανισμό (Dew et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν συλλέξει ικανοποιητικό όγκο δεδομένων και έχουν καταλήξει, ότι οι πολυφαινόλες πράγματι διαθέτουν τα εχέγγυα ως παρεμποδιστές ασθενειών. Για το λόγο αυτό υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν, μεταξύ άλλων, την ευεργετική δράση των πολυφαινολών στις φλεγμονές, στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στην καρκινογένεση, στην οστεοπόρωση και πιθανότατα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και στο διαβήτη (Hertog et al, 1995, Tapiero et al, 2002, Scalbert et al, 2004, Han et al, 2007). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται συνοπτικά οι βιολογικές δράσεις δαιτητικών πολυφαινολών:



Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις διαιτητικών πολυφαινολών (Han et al, 2007)

Αναλυτικότερα λοιπόν:

➤ 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).

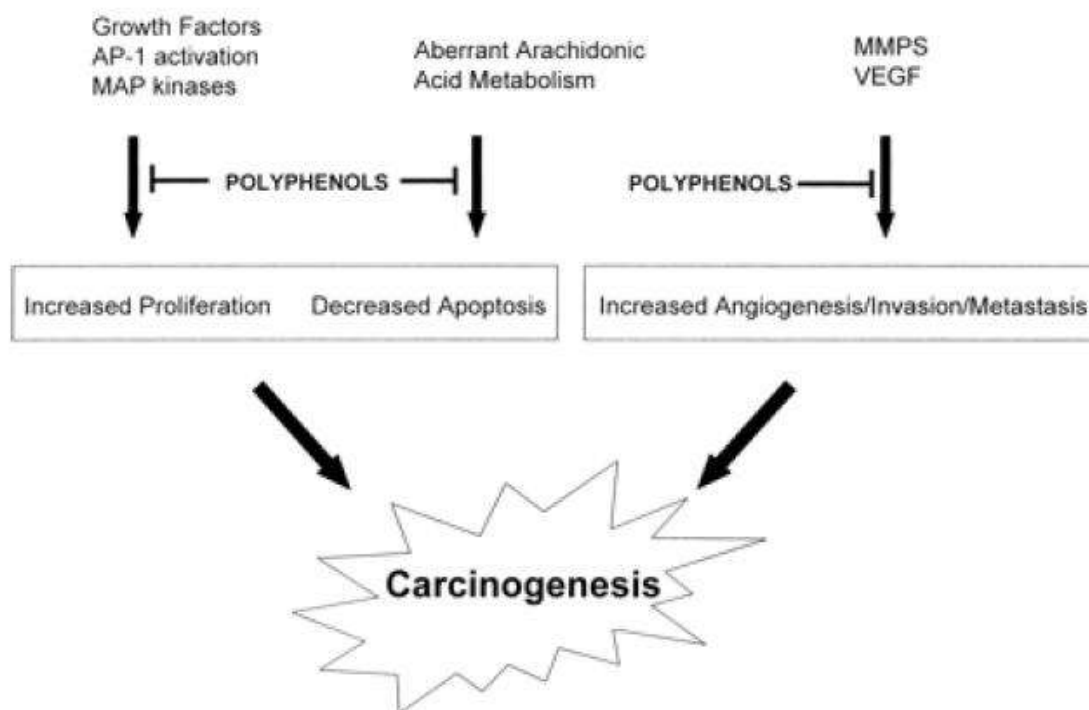
Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έγκεται στο γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως “ δεσμευτές” ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η αντιοξειδωτική δράση τους εκδηλώνεται με προστασία της LDL από την οξείδωση, αλλά και με δράση έναντι οξειδωτικών παραγόντων του επιθηλικού ιστού, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και έτσι, να μειώνεται ο κίνδυνος καρδιοπαθειών (Halliweel, 1999, Χίου, 2006). Τα φαινολικά συστατικά διαθέτουν ιδανικές χημικές δομές για να “δεσμεύουν” τις ελεύθερες ρίζες και έχει αποδειχτεί *in vitro* ότι είναι πιο αποτελεσματικά ανιοξειδωτικά από τις βιταμίνες E και C (Rice-Evans et al, 1997). Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν και αναστέλλουν/διακόπτουν την οξείδωση μέσω ελευθέρων ριζών με 3 τρεις τρόπους (Χίου, 2006):

- i. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και τις εξουδετερώνουν. Μέσω αυτής της διαδικασίας καθίστανται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες όμως είναι πιο σταθερές ακριβώς λόγω της πολυφαινολικής δομής, η οποία μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά.
- ii. Δρουν ως δεσμευτές (κυρίως τα φλαβονοειδή) μεταλλικών ιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al, τα οποία συχνά είναι οι απαρχητές μιας οξείδωσης. Αυτό γίνεται μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου με το μεταλλικό ιόν.
- iii. Αναγεννούν ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, τη βιταμίνη E.

➤ Άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι οι πολυφαινόλες, εκτός από την παρεμπόδιση της οξειδωσης της LDL, διαθέτουν πρόσθετες καρδιοπροστατευτικές λειτουργίες, όπως να τροποποιούν την ηπατική απορρόφηση χοληστερόλης, τη σύνθεση και έκκριση τριγλυκεριδίων και να επεξεργάζονται τις λιποπρωτεΐνες στο πλάσμα. Έτσι, ο κίνδυνος καρδιαγγειακών νοσημάτων μειώνεται, βελτιώνοντας την περιεκτικότητα του πλάσματος σε λιπίδια και μειώνοντας τις φλεγμονές (Zern & Hernandez, 2005).

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά των φυσικών φυτικών τροφίμων, κυρίως φρούτων και λαχανικών, έχουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι της καρκινογένεσης, προστατεύοντας το DNA από τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν την καρκινογένεση “μπλοκάροντας” συγκεκριμένες καρκινογενετικές οδούς και επηρεάζοντας τα μοριακά γεγονότα των σταδίων έναρξης, προώθησης και εξέλιξης (Halliwell, 1999, Urquiaga & Leighton, 2000, Stocket et al, 2004). Κατά τη Bravo (1998), πολλά είδη των πολυφαινολών (φαινολικά οξέα, υδρολυμένες ταννίνες, φλαβονοειδή) δείχνουν αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, παρεμβαίνοντας σε πολλά από τα βήματα που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων και αδρανοποιώντας τους καρκινογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση την έκφρασης της μετάλλαξης γονιδίων και τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων και ενζυματικών συστημάτων

Έτσι, 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, την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, αλλά και την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης. Η παρακάτω εικόνα δείχνει κάποιους από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς (Lambert et al, 2005).



Εικόνα 11: Μηχανισμοί παρεμπόδισης καρκινογένεσης από διαιτητικές πολυφαινόλες

- Σύμφωνα με τον Vita (2005), οι πολυφαινόλες επιδρούν θετικά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών ιστών. Έτσι εμφανίζουν αντιαλλεργικές ιδιότητες (παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων), αλλά και προστασία επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος.
- Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν το ρόλο των πολυφαινολών στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert A. et al, 2005).
- Ακόμη, παρατηρείται αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO.
- Επιπλέον, εμφανίζεται επίδραση των πολυφαινολών στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών. Κυρίως οι εκτενώς πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων), με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της απορρόφησης.

➤ Τέλος, οι πολυφαινόλες και κυρίως η τάξη των φλαβονοειδών παρουσιάζουν αντιθρομβωτικές και ανιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Gerritsen et al, 1995, Muldoon & Kritchevsky, 1996), ενώ τεκμηριωμένη φαίνεται να είναι και η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών συστατικών (Chung et al, 1998, Parkar et al, 2008).

➤ Αξίζει να σημειωθεί ότι 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).

1.4 ΧΕΙΛΑΝΘΗ

1.4.1 Η οικογένεια των χειλανθών

Ελληνική ονομασία της οικογένειας δικοτυλήδων φυτών Lamiales ή Labiales είναι γνωστή και ως οικογένεια των λαμπιατών (από τη νεολατινική ονομασία της). Η οικογένεια των χειλανθών περιλαμβάνει παγκοσμίως περίπου 236 γένη και 6900 με 7200 είδη ποωδών, ημιθαμνωδών ή θαμνωδών φυτών, σπανίως δέντρων, τα οποία είναι ιθαγενή των εύκρατων ζωνών (Παντάκης Γ., 2012). Κύριο κέντρο εξάπλωσής τους είναι οι παραμεσόγειες περιοχές, αλλά κάποιες ομάδες συναντώνται ακόμη στην Αυστραλία, τη Νοτιοδυτική Ασία καθώς και τη Νότιο Αμερική (Raymond M. Harley et al, 2004). Χαρακτηρίζονται από τετραγωνικό βλαστό και τα φύλλα τους είναι διατεταγμένα αντίθετα. Τα άνθη είναι ισχυρώς ζυγόμορφα και διαθέτουν κατά κανόνα δίχειλο, πενταμερή κάλυκα και δίχειλη, πενταμερή, συμπέταλη στεφάνη με σωληνοειδή βάση· στις περισσότερες περιπτώσεις, από τα πέντε πέταλα της στεφάνης τα δύο σχηματίζουν το πάνω χείλος και τα τρία το κάτω. Ο καρπός τους είναι θραυστόκαρπος, ο οποίος διασπάται σε τέσσερα μονόσπερμα καρπίδια.

Στα χειλανθή περιλαμβάνονται πολλά χρήσιμα και αξιόλογα φυτά, με έντονο οικονομικό ενδιαφέρον, όπως το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*), η φασκομηλιά (*Salvia officinalis*), η ρίγανη (*Origanum vulgare*), το θυμάρι (*Thymus vulgaris*), η λεβάντα (*Lavandula angustifolia*), η μέντα (*Mentha piperita*), το τσάι

του βουνού (*Sideritis*) και ο βασιλικός (*Ocimum basilicum*) (Kokkini S. et al, 2004). Αρκετά χειλανθή με ποικιλόχρωμα άνθη συναντώνται αυτοφυή στα λιβάδια και στα δάση, όπως τα είδη των γενών *Ajuga*, *Teucrium*, *Stachys*, *Glechoma* κ.ά.

Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας, λόγω της παρουσίας αδένων ή αδενωδών τριχών, είναι αρωματικά καθώς εκκρίνουν αιθέρια έλαια από τους αδένες αυτών 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 προέλευση 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, αλλά ακόμη και να αναγεννηθούν με κυτταροκαλλιέργειες βλαστοκυττάρων. Επιπλέον, καλλιεργούνται για καλλωπιστικούς σκοπούς, για μαγειρική χρήση ως μυρωδικά χάρη στα εδώδιμα φύλλα τους, όπως η ρίγανη. Τέλος φυτά της οικογένειας των χειλανθών παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις, όπως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αγχολυτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες, συμβάλλοντας έτσι στη θεραπεία πολλών 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 γένος *Salvia* κατατάσσεται στα αγγειόσπερμα, δικότυλα φυτά, ανήκει στην τάξη *Lamiales* και είναι το μεγαλύτερο γένος της οικογένειας των Χειλανθών

(*Lamiaceae*), στην τάξη των Λαμιωδών (*Lamiales*), στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων, με περίπου 900 είδη στον παλιό και νέο κόσμο (Sutton John 2004, Clebsch Betsy). Το όνομα του γένους *Salvia* προέρχεται από το λατινικό ρήμα *salvare* (= σώζω ζωές). Στην Ελλάδα συναντούμε 23 είδη φασκόμηλου με κοινές ονομασίες όπως ελελίφασκος, αλιφασκιά, φασκομηλιά, μηλοσφακιά, και αγριοφασκιά (Davis P., 1982). Τα είδη του γένους αυτού είναι φυτά φρυγανώδη ή θαμνώδη και πόες μονοετείς ή πολυετείς, που ευδοκιμούν σε ηλιόλουστες περιοχές με αλκαλικά εδάφη και το ύψος του κυμαίνεται από 20 cm ως 1,70 m. Είναι συνήθως διακλαδισμένα με βλαστούς κατά κανόνα όρθιους και περισσότερο ή λιγότερο αρωματικά. Έχουν φύλλα αντίθετα, συνήθως χνουδωτά, ακέραια, οδοντωτά, πριονωτά, έλλοβα ή πτεροσχιδή, έμμισχα, ωοειδή, επιμήκη, λογχοειδή ή καρδιόσχημα. Οι ανθοφόροι βλαστοί καταλήγουν σε σπονδυλωτές ταξιανθίες από άσπρα, κόκκινα, πορφυρά, ρόδινα, κιτρινωπά, κυανά ή ιώδη άνθη (Βαρδαβάκη, Καββαδάς 1994). Κυρίως χρησιμοποιούνται τα φύλλα και οι ανθισμένες κορυφές ορισμένων ειδών που έχουν πολύ αρωματική, χαρακτηριστική οσμή και ελαφρά πικρή γεύση. Από αυτά με απόσταξη, λαμβάνεται αιθέριο έλαιο (1,5-2,5% ή και περισσότερο), το οποίο περιέχει κυρίως τις οργανικές χημικές ενώσεις θουγιόνη, και επίσης κινεόλη, καμφορά κ.α. Στα είδη αυτά, εκτός από το αιθέριο έλαιο, περιέχονται ακόμη φλαβονοειδή, οργανικά και τριτερπενικά οξέα και βιταμίνες (B1, C). Στα συστατικά αυτά οφείλεται η φυσιολογική δράση του φασκόμηλου. Τα είδη που είναι γνωστά ως φασκομηλιές καλλιεργούνται με σπόρους ή με μοσχεύματα, σε έδαφος ελαφρό, ζεστό, ασβεστούχο, πορώδες.

Σημαντικότερα από τα είδη που απαντούν αυτοφυή στην Ελλάδα είναι η *Salvia officinalis* (*Salvia* η φαρμακευτική), *Salvia fruticosa* ή *triloba*, *Salvia pomifera*, *Salvia sclarea*, *Salvia viridis*, *Salvia horminoides*, *Salvia divinorum* και *Salvia rutilans*. Σήμερα διαθέτουμε αρκετά ικανοποιητική γνώση των βιοσυνθετικών διεργασιών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα φυτά και οδηγούν στο σχηματισμό δευτερογενών μεταβολιτών φαρμακευτικής σημασίας.

Τα κυριότερα είδη:

Salvia officinalis (Σάλβια η Δαλματική)



Εικόνα 102: Φυτό του γένους *Salvia officinalis*

Είναι μικρός αειθαλής αρωματικός θάμνος. Έχει βλαστό τετραγωνικό, πολύκλαδο, χνουδωτό, ύψους 30 – 50 εκατοστά, φύλλα λογχοειδή ή προμήκη, οδοντωτά, χνουδωτά, συνήθως πράσινα. Ευδοκίμει τόσο σε θερμές όσο και σε ψυχρές περιοχές (νησιά, ηπειρωτική Ελλάδα) και σε χωράφια ασβεστούχα, μέτριας γονιμότητας, ξηρικά. Καλλιεργείται επίσης στην πρώην Γιουγκοσλαβία, στην Αλβανία, στην Τουρκία, στην Ιταλία, στην Ελλάδα, στις Η.Π.Α, στην Ισπανία και στην Κρήτη (Skoula

et.al, 2000).

Άνθη κυανιώδη, ροδόχρωμα ή λευκά, ανά 5-10, σε αραιούς σπονδύλους (σχηματίζουν στενό, απλό βότρυ). Βράκτια ωοειδή, βραχύτερα του κάλυκα (πέφτουν εύκολα). Κάλυκας 1-1,4 cm, δίχειλος, χνουδωτός, αδενώδης. Στεφάνη 2-3,5 cm (διπλάσια ή τριπλάσια του κάλυκα), με το ανώτερο χείλος σχεδόν ευθύ, επίπεδο. Σωλήνας με δακτύλιο εσωτερικά. Η άνθηση γίνεται κατά την περίοδο Μαΐου – Αυγούστου.

Πολλαπλασιάζονται με σπόρο που σπέρνεται σε σπορείο ή απευθείας στο χωράφι με μοσχεύματα και με παραφυάδες. Η σπορά και η μεταφύτευση γίνεται το φθινόπωρο ή την άνοιξη σε αποστάσεις 40 – 50 επί 70 – 80 εκατοστά. Είναι φυτό αρωματικό, φαρμακευτικό και μελισσοτροφικό. Το υπέργειο τμήμα χρησιμοποιείται ως τσάι, ενώ θεωρείται τονωτικό, ευστόμαχο, διουρητικό, αντισπασμωδικό, κατευναστικό των νεύρων, αντιαμορραγικό, στυπτικό, αντιβηχικό, αντιαθριτικό, αντιπυρετικό, εμμηναγωγό, αεραγωγό και αποχρεμπτικό.

Αρκετές φυτοχημικές έρευνες έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο της *Salvia officinalis* χαρακτηρίζεται από δύο μεγάλες χημικές κατηγορίες δευτερογενών μεταβολών. Αυτές είναι τα τερπενοειδή και οι φαινόλες. Το αιθέριο έλαιο της *Salvia officinalis* είναι άχρωμο έως ελαφρά κιτρινοπράσινο με χαρακτηριστική πικάντικη οσμή και νότα ξύλου. Το έλαιο συχνά νοθεύεται με φθηνότερο έλαιο τούγιας ή τουγιόνης η οποία λαμβάνεται ξανά από έλαιο τούγιας ή συνθετική τουγιόνη. Είναι ένα από τα πλέον μελετημένα είδη. Τα κυρίαρχα συστατικά του

είναι η α - και η β -θουιόνη (2,6-65,7%), ακολουθούμενες από την καμφορά (1,9-27,7%) και το α -πινένιο (0,9-7,2%), την 1,8-κινεόλη (0,7-22,5%), το β -πινένιο (0,5-17,9%), το καμφένιο (1,7-10,3%) και το α -πινένιο (0,9-7,2%). Η εμπορική αξία του αιθέριου ελαίου καθορίζεται από τα ποσοστά της α - και της β -θουιόνης καθώς και της καμφοράς που περιέχει. Πιο εμπορεύσιμα αιθέρια έλαια θεωρούνται αυτά που έχουν περιεκτικότητα σε α - και β -θουιόνη >30% και σε καμφορά <20%. Υπάρχουν δύο τουλάχιστον χημειότυποι, ένας με χαμηλή περιεκτικότητα σε β -θουιόνη (4-8%) και ένας με σχετικά υψηλό ποσοστό (16-32%). (Πιτακοίλη, Τζάκου, Κουλάδη, 2009).

Salvia fruticosa ή tribola (Σάλβια η τρίλοβη)



Εικόνα 13: Φυτό του γένους *Salvia fruticosa/tribola*

Κοινώς είναι γνωστό ως αλισφακιά (*Greek sage*) και αποτελεί το πιο κοινό είδος του γένους *Salvia* στην Ελλάδα. Ειδικότερα, φύεται στη Ν. Ελλάδα και τα νησιά του Αιγαίου σε περιοχές χαμηλών υψομέτρων (<300m) με εξαίρεση την Κρήτη (μέχρι τα 1200m) κυρίως σε θαμνώδεις βραχώδεις τόπους, συχνά σε παραθαλάσσιους γκρεμούς, σε φρύγανα ή διάκενα δασών πεύκης, σε ασβεστόλιθους, κυρίως στη μεσογειακή ζώνη βλάστησης. Γενικότερα, είναι είδος των περιοχών της Α. Μεσογείου (από την Ιταλία μέχρι την Παλαιστίνη).

Είναι αρωματικός θάμνος με ύψος μέχρι 1m, στελέχη όρθια μερικές φορές με διογκώσεις (τα φασκόμηλα ή galls), τετραγωνικά (τα νεαρά) συχνά πορφυροειδή, με ποικίλο τρίχωμα, μερικές φορές γυμνά. Φύλλα αντίθετα σταυρωτά σε όλο μήκος των κλάδων, απλά τρίλοβα με το μεγαλύτερο μέρος του φύλλου επάκριο και ένα ζεύγος πολύ μικρότερων στη βάση, ελλειψοειδή έως ωοειδή επιμήκη, με καρδιοειδή ή σφηνοειδή βάση, με κυματοειδή παρυφές, χνουδωτά κάτω και γκριζοπράσινα. Ο μίσχος του είναι 0,5- 1,5 (-3,5) cm. Τα άνθη εμφανίζονται ιώδη μέχρι γαλανιώδη, ροδόχρωμα ή λευκά, βραχυπόδικα, ανά (2-)6-10 σε ψευδοσπονδύλους (4-10). Ο κάλυκας είναι μήκους 0,6-1 cm σωληνοειδής μέχρι καμπανοειδής με πυκνές, βραχείες και μακριές, αδενώδεις τρίχες και μερικούς

άμισχους αδένες, συχνά με πορφυριώδεις αποχρώσεις. Η στεφάνη του έχει μήκος 1,6-2,4 cm και ο σωλήνας 1,1-1,4 cm, ενώ βαθμιαία διαπλατύνεται προς το λαιμό. Το ανώτερο χείλος είναι ευθύ, δισχιδές, με αδενώδεις τρίχες εξωτερικά και το κατώτερο ισόμηκες, με σχεδόν κυκλικό μεσαίο λοβό και πλατιά ωοειδείς πλευρικούς λοβούς. Οι στήμονες είναι 4, μήκους 0,5 cm, επιπετάλιοι και διδύμοι με νήματα. Ο ύπερος είναι γυμνός με 2 καρπόφυλλα και στίγμα άνισα δισχιδές. Η άνθηση παρατηρείται συνήθως την περίοδο Μαρτίου – Ιουλίου (Καβαδά Δ.,1958).

Salvia pomifera (Σάλβια η μηλοφόρος ή κόκκινη ή Χανιώτικη)



Εικόνα 14: Φυτό του γένους *Salvia Pomifera*

Πρόκειται για θάμνο ύψους 0,5-1 m. Με βλαστούς πολλούς και αδενώδεις προς την κορυφή. Φύλλα έμμισχα, ωοειδή ή επιμήκη ελλειψοειδή, αβαθώς οδοντωτά. Κοινώς είναι γνωστό ως πικρή φασκομηλιά (*Cretan sage*) και φύεται στη

Ν. Ελλάδα σε υψόμετρο 0-500 m., στην Δ. Κρήτη μέχρι τα 1200 m., σε πετρώδεις

λοφοπλαγιές (φυτό ημιθαμνώδες, ύψους 1 μέτρου με λείες στρογγυλές κηκίδες στο βλαστό, οι οποίες τρώγονται από τους Άραβες και λέγεται ότι σβήνουν τη δίψα). Παλιότερα οι χωρικοί συνέλεγαν τις κηκίδες αυτές την Πρωτομαγιά και τις έβραζαν σε ζάχαρη.

Τα φύλλα του είναι απλά έμμισχα, ωοειδή, στρογγυλά ή καρδιοειδή στη βάση, τραχειά, με πυκνό βελουδένιο χνούδι. Τα άνθη εμφανίζονται σε σπονδύλους ανά 2-4, γαλάζια-βιολετί, με το κατώτερο χείλος πιο ανοιχτόχρωμο. Η στεφάνη του φυτού είναι περίπου 35 mm, ενώ ο κάλυκας είναι μήκους 10-12 mm, συχνά κόκκινο-πορφυρός, με αδενώδεις τρίχες και επιφυείς αδένες. Ανθίζει κατά την περίοδο Μαΐου – Ιουνίου.

Salvia sclarea (Σάλβια η ερυθρανθής)



Εικόνα 15: Φυτό του γένους *Salvia sclarea*

Είναι κοινώς γνωστό με τα ονόματα ερυθρανθής σκλάρεα, γοργόγιαννης (Clary sage) κ.ά. Απαντάται σε πετρώδεις τόπους της Θράκης, της Μακεδονίας, της Ηπείρου, της Θεσσαλίας, της Πελοποννήσου και των Ιονίων νησιών. Βρίσκεται επίσης αυτοφυής στη Γαλλία σε ασβεστώδεις λόφους, στην Προβηγκία και στις παραθαλάσσιες Άλπεις.

Καλλιεργούμενο μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 1 έως 1,5 μέτρα. Τα φύλλα του είναι μεγάλα και ανωμάλως οδοντωτά, μήκους 7-8 και πλάτος 3-13 εκ., η κάτω επιφάνειά του διατρέχεται από πολλά νεύρα που προεξέχουν. Ο βλαστός καταλήγει σε ένα ανθοφόρο στάχυ από ωραία λουλούδια, που έχουν λευκορόδινο χρώμα με αραιά ιώδη στίγματα. Ο κάλυκας του είναι χνουδωτός με πολλές αδενώδεις τρίχες, με 13 δε κύρια νεύρα στο επάνω μέρος και χωρίζεται σε δύο χείλη. Το επάνω χείλος έχει τρεις ανόμοιες προεξοχές (δόντια), από τις οποίες η μεσαία είναι πιο χαμηλή από τις δύο πλάγιες. Το κάτω χείλος έχει δύο μόνον προεξοχές. Η στεφάνη είναι δίχειλη και ξεπερνάει πολύ τον κάλυκα, το δε επάνω χείλος είναι γυρισμένο σαν δρεπάνι. Ο καρπός του είναι ένα τετράχωρο καρπίδιο, έχει δε μέσα σε κάθε ένα σκοτεινόχρωμο σπόρο με καστανέες φλέβες. Όλο το φυτό είναι χνουδωτό και κολλώδες λόγω της παρουσίας άφθονων αδενωδών τριχών, μέσα στις οποίες βρίσκεται το αιθέριο έλαιό του, το οποίο αναδίδει ειδική γλυκιά οσμή και χρησιμοποιείται για αρωματισμό του καπνού. Ανθίζει την περίοδο Ιουνίου-Αυγούστου (Σκουμπής, 1998).

1.4.2.2 Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Το φασκόμηλο εμφανίζει εξαιρετικές θεραπευτικές ιδιότητες. Δεν είναι λοιπόν τυχαία η χρήση του στην πορεία των χρόνων από διαφόρους πολιτισμούς, από εποχές που η ιατρική βρισκόταν ακόμη σε αρχικό στάδιο. Όπως προαναφέρθηκε, το βοτανολογικό του όνομα *salvia* προέρχεται από την λατινική λέξη *salvare* που σημαίνει "θεραπεύω" και εξαιτίας των θεραπευτικών του δυνάμεων και ιδιοτήτων το ονόμαζαν και "*salvia salvatrix*" δηλαδή σάλβια ο

σωτήρ. Ακόμη, μια μεσαιωνική παροιμία -κατά άλλους παλιά αραβική- έλεγε "γιατί να πεθάνει ένας άνθρωπος όταν στον κήπο του φυτρώνει φασκόμηλο;", ενώ η παράδοση των αγγλόφωνων λαών πίστευε ότι η φασκομηλιά φύτρωνε και ευδοκιμούσε μόνον σε κήπους σοφών και όπου αφέντης του σπιτιού ήταν η γυναίκα.

Το φασκόμηλο λοιπόν χρησιμοποιείται ευρέως κατά του κρυολογήματος, των ρευματισμών και των πυρετών (Bayrak A. et al 1987, Sezik E. et al, 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). Βοηθά στη ρύθμιση της έμμηνου ρύσης, ενώ, είναι κατά τόσο της αμηνόρροιας όσο και της δυσμηνόρροιας, χάρη στην οιστρογονική δράση που εμφανίζει. Πιστεύεται επίσης ότι βοηθά στην ενίσχυση της μνήμης, ότι καταπολεμά τη νωθρότητα, ενώ ταυτόχρονα δρα κατά των νευροπαθειών. Επιπλέον, είναι ευεργετικό για το τριχωτό της κεφαλής. Εκχυλίσματα και διάφορα αιθέρια έλαια του γένους *Salvia* χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καθώς και στην αρωματοποιία. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω των διεγερτικών του ιδιοτήτων, το φασκόμηλο πιστεύεται ότι θα πρέπει να αποφεύγεται από άτομα υπερτασικά.

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 (Miuca et al., 2000). Συνοπτικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα ενεργά συστατικά του φασκόμηλου είναι:

~Πτητικό έλαιο-θυϊόνη, περίπου 50%

~Πικρές διτερπενοειδείς ουσίες

- ~Ταννίνες
- ~Φλαβονοειδή
- ~Φαινολικά οξέα, όπως ροσμαρινικό οξύ
- ~Τανασετόνη

Αναλυτικότερα:

ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Τριτερπενοειδή

Τα πιο κοινά τριτερπενοειδή, που απαντώνται στα περισσότερα είδη *Salvia* είναι τα ουρσολικό και ολεανολικό οξύ, τα οποία έχουν απομονωθεί από τη *Salvia officinalis*. Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και άλλα τριτερπενοειδή από διάφορα είδη *Salvia*. Ενδεικτικά αναφέρονται τα: αναγαδιόλη, οξικός εστέρας της ταραξερόλης, γερμανικόλη, οξικός εστέρας του α-αμιραδιενυλίου και νιβαδιόλη από τη *S. broussonetti* (Ulubelen A, 2000).

Διτερπενοειδή

Τα είδη *Salvia* περιέχουν διτερπενοειδή τύπου αβιετανίου, κλεροδανίου, πιμαρανίου και λαβδανίου. Τα είδη *Salvia*, με εξαίρεση τα αμερικάνικα είδη, περιέχουν κυρίως διτερπένια τύπου αβιετανίου στις ρίζες τους, ενώ διτερπένια τύπου κλεροδανίου και λαβδανίου είναι αρκετά σπάνια. Στα αμερικάνικα είδη διτερπένια τύπου κλεροδανίου βρίσκονται στα εναέρια τμήματα ή σε ολόκληρο το φυτό (Ulubelen A, 2000).

Διτερπένια τύπου αβιετανίου

Οι τανσινόνες είναι αρκετά γνωστά διτερπένια τύπου αβιετανίου που πρωταπομονώθηκαν από τη *S. miltiorrhiza*. Τα πρώτα διτερπένια που ανιχνεύθηκαν από το φυτό αυτό ήταν οι τανσινόνες I, II και III και αργότερα οι ισοτανσινόνες I και II και ισοκρυπτοτανσινόνη και κρυπτοτανσινόνη.

Ένας μεγάλος αριθμός διτερπενίων τύπου αβιετανίου απομονώθηκαν από διάφορα είδη *Salvia*. Αναφέρονται οι πομιφερίνες A-G που προέρχονται από τη *S. pomifera* (Ulubelen A, 2000).

Τροποποιημένα διτερπένια τύπου αβιετανίου

Τροποποιημένα διτερπένια τύπου αβιετανίου έχουν αναφερθεί από είδη *Salvia*, όπως η καντιντισιόλη από τη *S. candidissima* (Ulubelen A, 2000).

Διτερπένια τύπου κλεροδανίου

Τα αμερικάνικα είδη *Salvia* περιέχουν κυρίως διτερπένια τύπου κλεροδανίου στα εναέρια τμήματα ή σε ολόκληρο το φυτό και σπάνια τύπου αβιετανίου. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε φυτά από το βοτανικό κήπο του Παλέρμω στην Ιταλία, τα οποία είχαν προέλθει από το Μεξικό, βρέθηκαν νέα διτερπένια τύπου κλεροδανίου: σαλβικοκκίνη από τη *S. coccinea* και σαλβιφαρίνη και σαλβιφαρική από τη *S. farinacea* (Ulubelen A, 2000).

Διτερπένια τύπου λαβδανίου και πιμαρανίου

Αυτού του τύπου τα διτερπένια είναι σχετικά σπάνια στα είδη της *Salvia*. Ενδεικτικά αναφέρονται το οξείδιο της μανούλης που απομονώθηκε από τη *S. candidissima* subsp. *Occidentalis* (Ulubelen A, 2000).

Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια είναι σπάνια συστατικά των ειδών *Salvia*. Από τη *S. palaefolia*, ένα φυτό από τη Ν. Αμερική απομονώθηκαν δύο σεσκιτερπένια: το οξείδιο του καρνοφυλλενίου και το γλεχομαφουράνιο (Ulubelen A, 2000).

Σεστερπένια

Έχουν αναφερθεί σεστερπένια από διάφορα είδη *Salvia*, όπως ο μεθυλεστέρας του σαλβιλευκολιδίου από τη *S. hypoleuca* (Ulubelen A, 2000).

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Το γένος της *Salvia* περιέχει μία πληθώρα πολυφαινολικών, με περισσότερες από 160 ταυτοποιημένες ενώσεις, μερικές από τις οποίες είναι μοναδικές στο γένος. Ένας μεγάλος αριθμός των ουσιών αυτών προέρχονται από το καφεϊκό οξύ μέσω διαφόρων χημικών μετατροπών (Πιταροκοίλη Δ., 1999).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στο γένος *Salvia* και κυρίως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοσίδες αυτών. Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία 6-υδροξυλιωμένων φλαβονών έχει ιδιαίτερη χημειοταξινομική σημασία για το γένος.

Όσον αφορά το είδος *S. officinalis* ενδεικτικά αναφέρουμε τα εξής φλαβονοειδή:

Φλαβόνες: 5,4'-OH-7-OMe (γενκβανίνη), 5,7,4'-OH-6-OMe (ισπιντουλίνη), 5,4'-OH-6,7-OMe (σιρσιμαριτίνη), 5-OH-6,7,4'-OMe (σαλβιγενίνη), 5,7,3'4'-OH (λουτεολίνη), 5,7,4'-OH (απιγενίνη), 5,3',4'-OH-7-OMe, 5,7,3',4'-OH-6-OMe (νεπετίνη), 5,3',4'-OH-6,7-OMe (σιρσιλιόλη), 5,6,7,4'-OH (σκουτελαρεΐνη), 5,6,7,8,4'-OH (ισοσκουτελαρεΐνη). *Φλαβονόνες*: 5,7,3'-OH-4-OMe (εσπερετίνη).

Για το είδος *S. fruticosa* έχουν αναφερθεί τα κάτωθι φλαβονοειδή:

Φλαβόνες: 5,7,4'-OH-6,3'-OMe (τζασεοσιντίνη), 5-OH-6,7,4'-OMe (σαλβιγενίνη).

Φαινολικά οξέα

Λόγω του μεγάλου αριθμού των φαινολικών οξέων που ανιχνεύθηκαν σε είδη *Salvia* ενδεικτικά αναφέρουμε τα ακόλουθα:

S. officinalis: καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, *cis-p*-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, *trans-p*-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, σαλβιανολικό οξύ I, σαλβιανολικό οξύ K, σαζεκουμαρίνη, φερουλικό οξύ (Κουλάδη Μ., 2005).

1.4.3 Τσάι του βουνού (*Sideritis spp.*)

1.4.3.1 Βοτανικά στοιχεία

Το τσάι του βουνού στην Ελλάδα είναι γνωστό από την αρχαιότητα και αναφέρεται από το Θεόφραστο (372-287 π.Χ.) και τον Διοσκουρίδη (10ος μ.Χ. αιώνας). Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από τη λέξη σίδηρος και κατά μια εκδοχή δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με άλλη, επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από

αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος (González-Burgos E. et al, 2011). Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης.

Το γένος *Sideritis* περιλαμβάνει μια πληθώρα φυτικών ειδών αποτελούμενων από ετήσια ή πολυετή ποώδη φυτά, καθώς και μικρούς θάμνους. Ο βλαστός τους είναι απλός ή διακλαδισμένος σε δευτερεύοντες. Τα φύλλα του έχουν, όπως προαναφέρθηκε, σχήμα λόγχης και συνήθως είναι οδοντωτά. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, έχουν χρώμα λευκό ή συνηθέστερα κίτρινο και αναπτύσσονται σε ταξιανθία σταχίου (Γκολιάρης Α., 1987). Πρόκειται για αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae).

Κοινό χαρακτηριστικό των ειδών αυτών αλλά και γενικά του γένους *Sideritis* είναι ότι πρόκειται για φυτά ιδιαίτερα προσαρμοσμένα για να επιβιώνουν σε απόκρημνες βραχώδεις περιοχές με υψόμετρο άνω των 1000 μέτρων. Τα είδη αυτά είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Δεν απαιτούν πλούσια εδάφη και προτιμούν θέσεις, με ελαφρό έδαφος όχι ιδιαίτερα βαθύ, όχι συνεκτικό, με άφθονο ήλιο. Συναντώνται ιδιαίτερα σε σχισμές βράχων όπου ελάχιστα είδη φυτών θα μπορούσαν να επιβιώσουν (Γκολιάρης Α., 1987). Τα περισσότερα είδη του γένους *Sideritis* αυτοφύονται σε χώρες της Μεσογείου, ενώ πολλά είδη του γένους αυτού υπάρχουν και στην Ασία. Στην περιοχή της Μεσογείου, όπου φαίνεται να είναι και το κέντρο καταγωγής του φυτού, έχουν καταγραφεί πάνω από 140 διαφορετικά είδη του γένους *Sideritis* (Willis, 1966, Tutin et al., 1972, Strid & Tan, 1991). Η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών συναντάται στην Ιβηρική Χερσόνησο, με 45 τουλάχιστον είδη τα περισσότερα των οποίων είναι ενδημικά, ενώ 14 από αυτά απειλούνται σήμερα με εξαφάνιση. Χώρες πλούσιες σε πληθυσμούς και ποικιλία ειδών είναι επίσης η Ελλάδα, η Ιταλία και χώρες των ακτών της βόρειας Αφρικής. Σε όλες σχεδόν τις Μεσογειακές χώρες είδη του γένους αυτού είναι γνωστά, σε τοπική κλίμακα, ως βότανα για διάφορες χρήσεις. Όμως χρήση για την παρασκευή τσαγιού γίνεται μόνο στην Ισπανία και κυρίως στην Ελλάδα, όπου έχουμε και τη μεγαλύτερη κατανάλωση. Μέχρι τώρα καλλιέργεια ειδών του φυτού, γίνεται μόνο στην Ελλάδα. Το μέρος του φυτού που συλλέγεται είναι η ταξιανθία σε πλήρη άνθηση μαζί με 5-6 cm βλαστού. Οι ανθοφόροι βλαστοί ξηραίνονται ώστε να μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τα κυριότερα είδη στην Ελλάδα είναι:

Sideritis clandestine (Τσάι Μαλεβού ή τσάι Ταΰγετου)



Εικόνα 16: Φυτό του γένους *Sideritis clandestina*

Είναι πολυετής πόα, ύψους μέχρι 40 εκατοστά. Ο βλαστός του στη βάση είναι ξυλώδης, απλός ή διακλαδισμένος σε δευτερεύοντες. Τα φύλλα του είναι χνουδωτά, σταχτόχροα, επιμήκη - λογχοειδή, ακέραια ή πριονωτά, τα κατώτερα με μίσχο και τα ανώτερα επιφυή ή με μίσχο. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής, σκεπάζεται από πυκνές τρίχες και τα πέταλα του άνθους έχουν χρώμα κίτρινο. Αυτοφύεται πάνω στους βράχους, στις υπαλπικές και αλπικές περιοχές του Μαλεβού, του Ταΰγετου και της Κυλλήνης. Το αιθέριο έλαιο του *Sideritis clandestina* παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε α-pinene, β-pinene, myrcene και limonene.

Sideritis raeseri (Τσάι του Παρνασσού ή τσάι του Βελουχιού)



Εικόνα 17: Φυτό του γένους *Sideritis raeseri*

Είναι πολυετής πόα, ύψους μέχρι 40 εκατοστά. Ο βλαστός είναι λεπτός, χνουδωτός, συνήθως απλός, σπάνια διακλαδισμένος. Τα φύλλα του είναι στενά, λογχοειδή, τα κατώτερα με μίσχο και τα ανώτερα άμισχα. Έχουν χρώμα πράσινο ως λευκοπράσινο και είναι ακέραια ή ελαφρώς πριονωτά. Ο κάλυκας έχει λευκοπράσινο χρώμα, καταλήγει σε δόντια και τα πέταλα του άνθους έχουν χρώμα κίτρινο. Αυτοφύεται στον Παρνασσό, Τυμφρηστό (Βελούχι) και σε άλλα βουνά της Αιτωλίας, Δωρίδας και Φθιώτιδας. Το αιθέριο έλαιο του *Sideritis raeseri* παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε sesquiterpenes κυρίως germacrone και elemol acetate.

Sideritis scardica (Τσάι του Ολύμπου)



Εικόνα 18: Φυτό του γένους *Sideritis scardica*

Είναι πολυετής πόα. Ο βλαστός του είναι λίγο ξυλώδης στη βάση, είναι απλός ή διακλαδισμένος, με δευτερεύοντες. Τα φύλλα του είναι πράσινα λογχοειδή, ακέραια ή ελαφρώς πριονωτά, με λευκό χνούδι, τα κατώτερα έμμισχα και τα ανώτερα άμισχα. Ο κάλυκας είναι μάλλον κωδωνοειδής και καταλήγει σε δόντια, καλύπτεται από πυκνές τρίχες και τα πέταλα του άνθους έχουν χρώμα ζωηρό κίτρινο. Αυτοφύεται σε βραχώδη εδάφη της υπαλπικής ζώνης του Ολύμπου, Κισσάβου, Πηλίου και Σκάρδου. Το αιθέριο έλαιο του *Sideritis scardiaca* παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση σε β-pinene, carvacrol και α-pinene.

1.4.3.2 Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Το παρασκευαζόμενο αφέψημα με το όνομα «Τσάι του Βουνού» παρουσιάζει πολλές ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στα συστατικά του αιθέριου ελαίου του, όπως για παράδειγμα στα φλαβονοειδή. Οι ευεργετικές επιδράσεις οφείλονται στην αντιφλεγμονώδη, βακτηριοστατική και αντιοξειδωτική δράση του (Tadic V.M., 2012). Στην λαϊκή θεραπευτική το αφέψημα από τα υπέργεια τμήματα χρησιμοποιείται για τα κρυολογήματα, για τις παθήσεις του αναπνευστικού, καθώς δρα ως θερμαντικό, αποχρεμπτικό, μαλακτικό και αντισηπτικό για το βήχα, κατά της δύσπνοιας και της ρινικής συμφόρησης, αλλά και για τις παθήσεις του ουροποιητικού, αφού είναι καλό διουρητικό [Ανάσης Ε., 1976, Carper J. & Καρύδη Κ., 2004, Menghini et al., 2005 Θανασούλια Β., 2007,). Ακόμη, θεωρείται ευστόμαχο, εφιδρωτικό, τονωτικό, αντιερεθιστικό (Menghini et al., 2005), ευεργετικό για τα αιμοφόρα αγγεία της καρδιάς και αντιαναιμικό διότι περιέχει Fe (Flocas et al, 1981), αντιφλεγμονώδες, αντιθρομβωτικό, και σπασμολυτικό. Επιπλέον, δεν ερεθίζει το νευρικό σύστημα (δρα και κατά του ήπιου άγχους) (Menghini et al, 2005) και γι' αυτό πλεονεκτεί του κοινού τσαγιού (Κευλάνης κ.λ.π.), γιατί δεν προκαλεί αϋπνία (Duke J. & Ζγουλέτα Ζ., 2006). Στην Ισπανία επίσης χρησιμοποιούνται διάφορα αυτοφυή είδη στη λαϊκή θεραπευτική, κυρίως για μακροχρόνια θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων. Ευρέως

διαδεδομένη είναι η *S. angustifolia* Lagasca (κοινώς ουρά του γάτου "rabo degato"), που χρησιμοποιείται ως λαϊκό φάρμακο, καθώς και στην Κτηνιατρική για τις πολύ σοβαρές πληγές των ζώων, κυρίως στην περιοχή της Βαλένθια και στην Καταλωνία (Barber J., 2002). Επίσης αποτελεί και συστατικό πολλών τροφών και γλυκισμάτων.

Επιπρόσθετα, 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. 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).

Τα εκχυλίσματα και τα περισσότερα αιθέρια έλαια του γένους *Sideritis* είναι βιοδραστικά, κυρίως λόγω της περιεκτικότητάς τους σε φλαβονοειδή και τερπενοειδή (Paranicolaou et al, 1984, Samaras et al, 2002). Αναλυτικότερα, όσον αφορά την:

Αντιφλεγμονώδη δράση

Υπάρχουν πολλές μελέτες πάνω στην αντιφλεγμονώδη δράση που εμφανίζουν τα εκχυλίσματα του γένους *Sideritis*. Αυτή οφείλεται κυρίως στις ομάδες (Duke J., 2002) των φλαβονοειδών, των τερπενίων και των λιπιδίων. Κατά των φλεγμονών δρουν και οι φυτοστερόλες, οι α- και β- αμιρίνες και τα διτερπένια (Charami M.T. et al, 2008).

Αναλγητική δράση

Φυτά του γένους *σιδερίτης* εμφανίζουν και αναλγητικές ιδιότητες. Αυτές οφείλονται σε ενώσεις λιγότερο πολικές από εκείνες των αντιφλεγμονωδών. Τέτοιες είναι οι φυτοστερόλες, οι α- και β- αμιρίνες και τα διτερπένια με σκελετό καουρενίου (Gonzalez-Burgos E. et al, 2011).

Αντιμικροβιακή δράση

Σημαντική είναι και η δράση κατά των βακτηρίων, των ιών και των ζυμών. Η δράση αυτή οφείλεται κυρίως στα αιθέρια έλαια του φυτού που περιέχουν μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες. Από τα φυτά που μελετήθηκαν πιο δραστικά ήταν αυτά με αιθέρια έλαια πλούσια σε α-πιπένιο και καρβακρόλη. Το είδος

S.raeseri δεν περιέχει πολλά μονοτερπένια και γι' αυτό ήταν αδρανές (Aligiannis N. et al, 2001, Fokialakis N. 2007).

Αντιοξειδωτική δράση

Ο Sideritis εμφανίζει και έντονη αντιοξειδωτική δράση. Ειδικότερα τα εκχυλίσματα των φυτών με οξικό αιθυλεστέρα και με βουτανόλη. Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται στην ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να μπλοκάρουν τις ελεύθερες ρίζες. Σε σύγκριση με άλλα αρωματικά φυτά της Μεσογείου η δράση του Σιδερίτη χαρακτηρίζεται μέτρια (Gonzalez-Burgos E. et al, 2011, Charami M.T. et al, 2008).

Επομένως, οι δράσεις των φυτών του γένους Sideritis οφείλονται σε τρεις φυτοχημικές ομάδες, που υπάρχουν σ' αυτά: στα φλαβονοειδή, στα διτερπένια και στα πτητικά συστατικά. 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).

1.4.4 Μέντα (Mentha spp.)

1.4.4.1 Βοτανικά στοιχεία

Η μέντα ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae), στην τάξη των Λαμιοδών (Lamiales), στην ομοταξία των δικοτυλήδων και στη συνομοταξία των αγγειοσπέρμων. Το όνομά της προέρχεται από το λατινικό *menthe* που προέρχεται από το αρχαιοελληνικό Μίνθη (Quattrocchi, Umberto, 1999). Ο αριθμός των ειδών της μέντας δεν είναι απόλυτα σαφής και υπολογίζονται γύρω στα 25 (Gulluce M. et al, 2007).

Τα φυτά αυτά είναι πολυετή με τετράγωνους βλαστούς. Φέρουν φύλλα επιμήκη, λογχοειδή με οδοντωτά άκρα διατεταγμένα σε αντίθετα ζευγάρια. Τα χρώματα των φύλλων ποικίλλουν από σκούρα πράσινα και γκριζοπράσινα σε μωβ, μπλε και μερικές φορές ανοικτό κίτρινο (Brickell C. et al, 1997). Τα λουλούδια

είναι λευκά-μωβ που παράγονται σε ψευδοσπονδυλώματα και οι καρποί είναι μικρές ξηρές κάψες που περιέχουν τέσσερα σπέρματα. Η μέντα μπορεί να ευδοκιμήσει σε ποικιλία κλιμάτων και εδαφών. Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τη μέντα είναι 17° C και, όταν αρδεύεται τακτικά, αντέχει και στις υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού. Αποδίδει καλύτερα σε εδάφη, βαθιά, πλούσια σε οργανική ουσία που δεν είναι πολύ βαριά, στραγγερά, με τιμή pH 6,5, αλλά και σε pH 6-7,5 δεν παρουσιάζει προβλήματα. Η σχέση των τριών θρεπτικών στοιχείων N, P, K είναι 1:0,4:1,6, αντίστοιχα. Το κάλιο κάνει τη μέντα πιο ανθεκτική στις μυκητολογικές ασθένειες. Η μέντα είναι πολύ απαιτητική σε νερό και σε πολύ θερμό καιρό η καλλιέργεια μπορεί να χρειασθεί και τρία ποτίσματα την εβδομάδα. Η μέντα είναι στείρο υβρίδιο, γι' αυτό δεν πολλαπλασιάζεται εγγενώς με σπόρο παρά μόνον αγενώς, με ριζώματα μοσχεύματα ή φυτάρια μικροπολλαπλασιασμού. Συγκομίζεται στην αρχή της ανθοφορίας (συνήθως αρχές Ιουλίου), ενώ από καλλιέργειες που είναι εγκατεστημένες σε εύφορα αρδευόμενα χωράφια, μπορεί να γίνει άλλη μία συγκομιδή το Σεπτέμβριο. Η δεύτερη συγκομιδή είναι ίσης ή μικρότερης απόδοσης.

Βάσει των άνωθεν κλιματικών χαρακτηριστικών συναντούμε τη μέντα στην Ευρώπη, τη Ν. Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία, τη Β. Αμερική (Brickell C. et al, 1997), και σε μεγάλη έκταση στις χώρες Ιαπωνία, Κίνα, Βραζιλία. Στην Ελλάδα, πιο συγκεκριμένα, η μέντα εκφύεται στο βορειοηπειρωτικό τμήμα της χώρας μέχρι τη Θεσσαλία, στη Στερεά Ελλάδα, στην Πελοπόννησο, στην Κρήτη και στην Κέρκυρα (μόνο η πράσινη) (11είδη).

Όλα τα είδη μέντας αναδίδουν ένα ιδιαίτερο έντονο άρωμα που οφείλεται σε ένα αιθέριο έλαιο που υπάρχει στα φύλλα και τα στελέχη και περιέχει μινθόλη (Kokkini S, 2004). Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο από τις δύο συγκομιδές μπορεί να φθάσει τα 8 λίτρα ανά στρέμμα και εξαρτάται κυρίως από την καλλιεργούμενη ποικιλία, το έδαφος, τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές πρακτικές. Διάφορα έντομα, όπως οι αφίδες (κοινώς μελίγκρα), οι νηματώδεις σκόληκες κ.ά. προσβάλλουν τη μέντα που, αν εξαιρέσει κανείς τους νηματώδεις, δεν υφίσταται μεγάλες ζημιές.

Η καλλιέργεια της μέντας για παραλαβή αιθέριου ελαίου άρχισε στην Ελλάδα το 1956. Η πρώτη φυτεία δοκιμαστικής καλλιέργειας εγκαταστάθηκε σε έκταση 90 στρεμμάτων του Σταθμού Γεωργικής Ερεύνης Αλιάρτου (Κωπαΐδα). Στα επόμενα χρόνια η μέντα καλλιεργείται και σε άλλες περιοχές της χώρας. Τα κυριότερα είδη

μέντας που απαντώνται στον Ελλαδικό χώρο είναι τα: *Mentha piperita* (μέντα η πιπερώδης), *Mentha viridis* (πράσινη μέντα), *Mentha pulegium* (μέντα η πουλέγιος), *Mentha longifolia* (αγριοδύσμος), *Mentha aquatica*, *Mentha arvensis*, *Mentha microphylla*, *Mentha rotundifolia* (γλυφώνι ή καλαμίθρα). Αναλυτικότερα:

Mentha pulegium (Μέντα η πουλέγιος / Μίνθη γλύγων)



Εικόνα 19: Φυτό του γένους *Mentha pulegium*

Κοινή ονομασία φλησκούνι, βληχώνι, φλεσκούνι ή βληχούνι. Χρησιμοποιείται κυρίως για να αρωματίζονται φαγητά. Είναι φυτό πολυετές, ύψους μέχρι 20 εκατοστά. Έχει βλαστό όρθιο ή πλαγιαστό, λίγο τριχωτό ή σχεδόν λείο, πρασινωπό. Τα φύλλα είναι μικρά, ωοειδή ή επιμήκη, με μικρό μίσχο. Τα άνθη βρίσκονται σε μαχαλιαίους σπονδύλους, χρώματος ρόδινου ή ιώδους. Η άνθηση αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί μέχρι και τον Οκτώβριο. Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου της είναι η πουλεγόνη, μια κετόνη, από την οποία πήρε το φυτό την ονομασία του.

Mentha longifolia (Κοινώς αγριοδύσμος)



Εικόνα 20: Φυτό του γένους *Mentha longifolia*

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).

1.4.4.2 Βιολογικές ιδιότητες και βιοδραστικά στοιχεία

Τα διάφορα είδη μέντας έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά στην ιατρική για τις ποικίλες ευεργετικές ιδιότητές τους, οι οποίες κατά κύριο λόγο οφείλονται

στα μονοτερπένια που βρίσκονται ως επί το πλείστον στα αιθέρια έλαιά τους και στις διάφορες πολυφαινόλες. Τα αιθέρια έλαια έχουν αντιμικροβιακή, αντι-ική και αντισπασμωδική δράση, ενώ διαλύουν και τα αέρια του στομάχου. Τελευταία διάφορα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται και ως φυσικά αντι-οξειδωτικά, ενώ ερευνάται και πιθανή αντικαρκινογόνος δράση τους. Η μινθόλη θεωρείται το πιο σημαντικό συστατικό της μέντας και χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς και διατροφικούς σκοπούς. Εμφανίζει αντιμικροβιακή, τονωτική, αντισπασμωδική (π.χ. καταπραΰνει το λόξιγγα), αναλγητική, καρδιοτονωτική, αντιβηχική και αντι-ασθματική δράση, ηρεμιστική για το στομάχι και κατά των ιλίγγων, της ταχυκαρδίας και των νευρικών διαταραχών.(Zheng W & Wang SY., 2001). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες, το τσάι ή το αιθέριο έλαιο του φυτού μειώνει τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο αίμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της υπερβολικής τριχοφυΐας στις γυναίκες.

Καταλυτικότερο ρόλο στα διάφορα είδη του γένους *Mentha* παίζουν τα φλαβονοειδή.Ο συγκεκριμένος συνδυασμός των λιπόφιλων πολυφαινόλων που συναντώνται στο εκάστοτε είδος, προσδίδει σε αυτό σημαντικές αντιοξειδωτικές, κυτταροπροστατευτικές, ηπατοπροστατευτικές, εναντίον του έλκους του στομάχου, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές, χημειοπροστατευτικές, αντιμυκητιακές, αντιβακτηριακές κ.α. δράσεις.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός των θεραπευτικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών της μέντας, έχουν αναφερθεί και σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στους ανθρώπους (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 ως εκτρωτικό. Ακόμη, η χρήση μέντας θα πρέπει λοιπόν να αποφεύγεται κατά το θηλασμό γιατί θεωρείται ότι συμβάλλει στη διακοπή του γάλακτος (Akdogan et al, 2004).

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων από τα γένη των φυτών *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 17. Τα υπό μελέτη εκχυλίσματα προέκυψαν με υδατική και μεθανολική εκχύλιση.

2. ΥΛΙΚΑ & 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 HepG2 κυττάρων αποτελούνταν από τα εξής:
 - Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
 - 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
 - Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)
 - 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
- 25ml FBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, στο στάδιο της προσθήκης 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*, *Sideritis* και *Mentha*. Τα εκχυλίσματα ήταν δύο τύπων: υδατικά και μεθανολικά. Τα είδη των προαναφερθέντων φυτών που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω (Πίνακας 1):

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα από τα γένη *Salvia*, *Mentha* και *Sideritis* και το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (TPC) (Stagos et al, 2012).

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

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

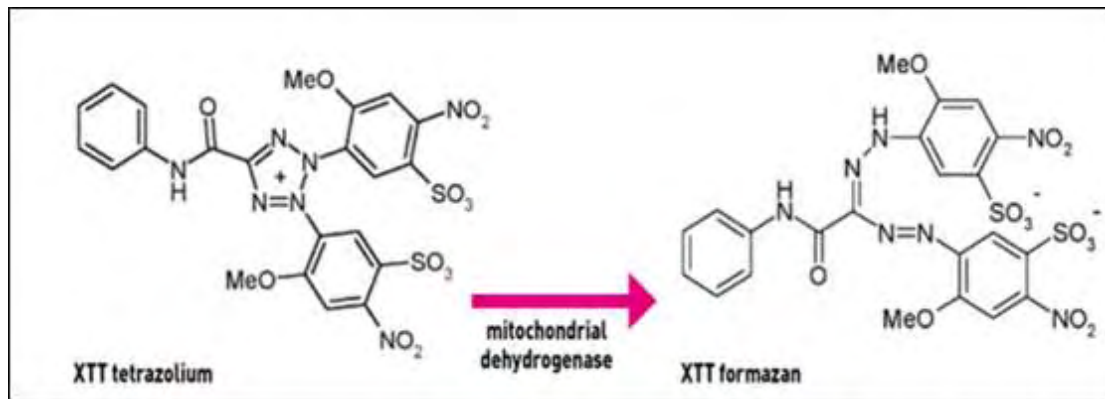
2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 σε 25cm² 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 CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split), αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 330 μL 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 γινόταν 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 *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis* στην καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την 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.



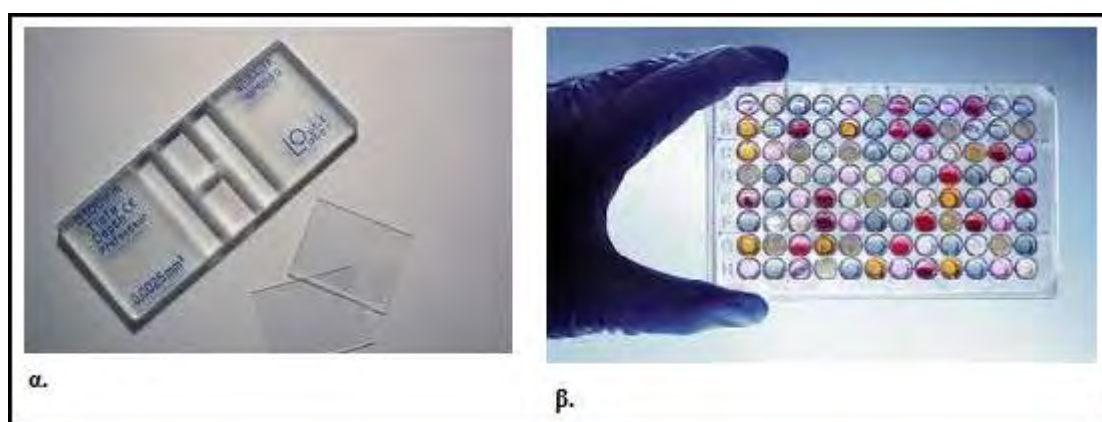
Εικόνα 21: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

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, προσθέτονταν 10000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προσθέτονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στις φλάσκες καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν 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 100μL. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων επωάζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτονταν 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 προσδιοριζόταν 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 HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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



Εικόνα 22 : 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 IC₅₀ και το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο έγινε κατά Spearman.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση 17 εκχυλισμάτων φυτών από τα γένη *Mentha*, *Salvia* και *Sideritis* στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG2). Τα εκχυλίσματα ήταν αρχικά σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, ανάλογα της αρχικής τους ποσότητας. Η μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το XTT assay. Η χρονική διάρκεια επώασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά HepG2 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 IC₅₀ (τιμές στις οποίες πεθαίνει το 50% των κυττάρων) είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής κάθε εξεταζόμενου εκχυλίσματος. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της κυτταρικής, αύξησης που παρουσιάζει το εκάστοτε εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα:

Μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω εκχυλισμάτων:

- *Εκχυλίσματα φυτών του γένους Salvia*

- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia fruticosa*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 72% στα 1600 µg/mL. IC₅₀=825 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia officinalis*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 50% στα 400 µg/mL. IC₅₀=400 µg/mL.
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia officinalis*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 83% στα 800 µg/mL. IC₅₀=240 µg/mL.
- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia pomifera calycina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 65% στα 1600 µg/mL. IC₅₀=420 µg/mL.

- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia pomifera calycina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 66% στα 800 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=325 \mu\text{g/mL}$.

- Υδατικό εκχύλισμα *Salvia pomifera pomifera*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 2,5, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 62% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=825 \mu\text{g/mL}$.

- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia pomifera pomifera*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% (πλήρης αναστολή) στα 800 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=396 \mu\text{g/mL}$.

Υδατικό εκχύλισμα *Salvia sclarea*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 79% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=927 \mu\text{g/mL}$.

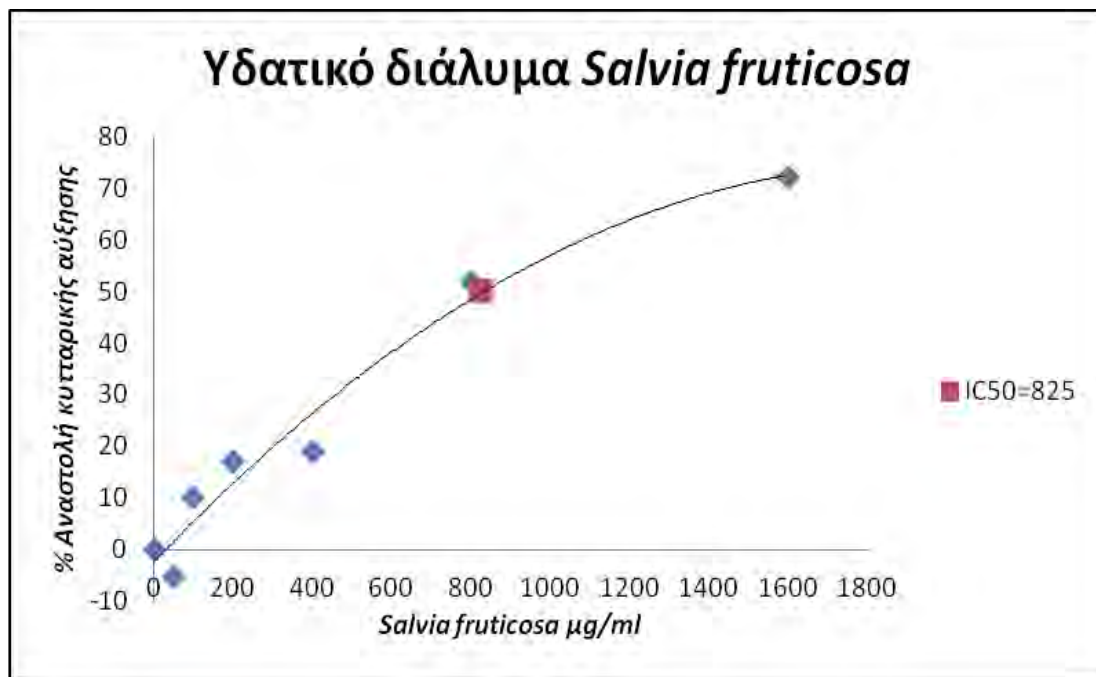
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia sclarea*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 70% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=513 \mu\text{g/mL}$.

- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους Sideritis***

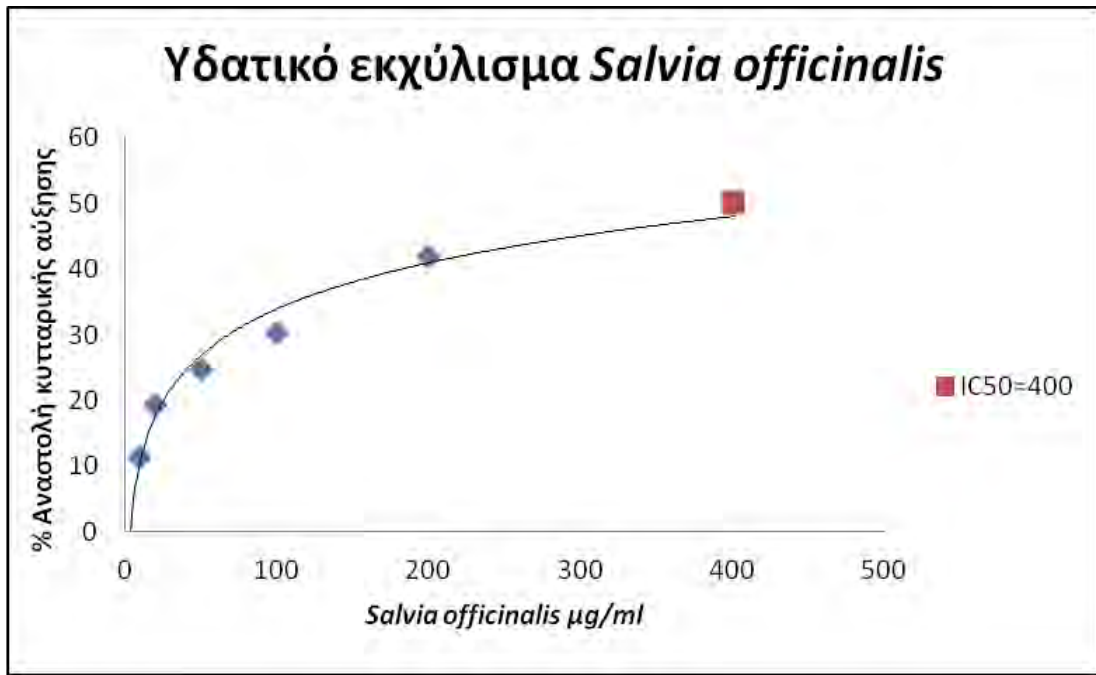
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis clandestina clandestina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 35% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν παρατηρήθηκε IC_{50} εντός του εύρους των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, ενώ κρίθηκε σκόπιμο να μην εξεταστεί η δραστηριότητα του εκχυλίσματος και σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς τότε θα γίνονταν ιδιαίτερα μεγάλη υπέρβαση του επιθυμητού εύρους τιμών στο οποίο είναι χρήσιμο να εντοπιστεί πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα.

- 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 55% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=1045 \mu\text{g/mL}$.
- 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 79% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=660 \mu\text{g/mL}$.
- 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 60% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=800 \mu\text{g/mL}$.
- Μεθανολικό εκχύλισμα *Sideritis raeseri raeseri*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400 και 800 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 81% στα 800 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=508 \mu\text{g/mL}$.
- Υδατικό εκχύλισμα *Sideritis scardica* - εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 45% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα δεν παρατηρήθηκε IC_{50} εντός του εύρους των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, ενώ κρίθηκε σκόπιμο να μην εξεταστεί η δραστηριότητα του εκχυλίσματος και σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, καθώς τότε θα γίνονταν ιδιαίτερα μεγάλη υπέρβαση του επιθυμητού εύρους τιμών στο οποίο είναι χρήσιμο να εντοπιστεί πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα.
- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους *Mentha****
 - Υδατικό εκχύλισμα *Mentha longifolia*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 400, 800 και 1600 $\mu\text{g/mL}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 89% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=814 \mu\text{g/mL}$.
 - 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 72% στα 1600 $\mu\text{g/mL}$. $\text{IC}_{50}=550 \mu\text{g/mL}$.

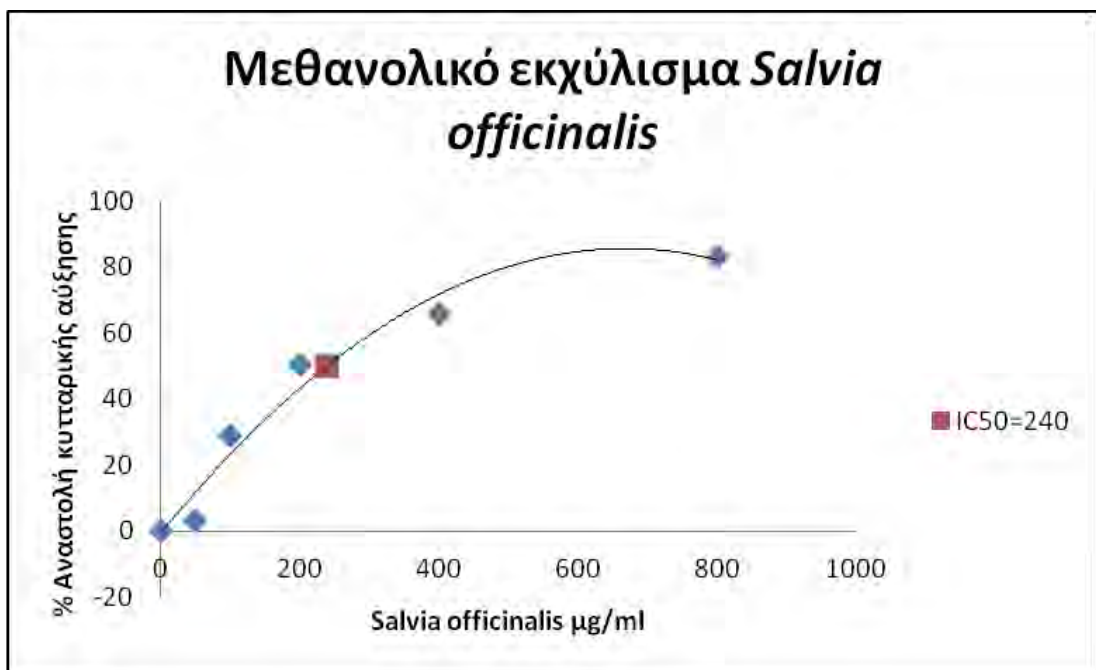
- Στα διαγράμματα 18 και 19 φαίνονται οι τιμές IC_{50} που παρουσίασε το σύνολο των εκχυλισμάτων και η συσχέτιση των τιμών αυτών με το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων (TPC) αντίστοιχα. Η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman έδειξε πολύ μικρή συσχέτιση των τιμών IC_{50} και του TPC, με συντελεστή συσχέτισης $r=-0,217$.



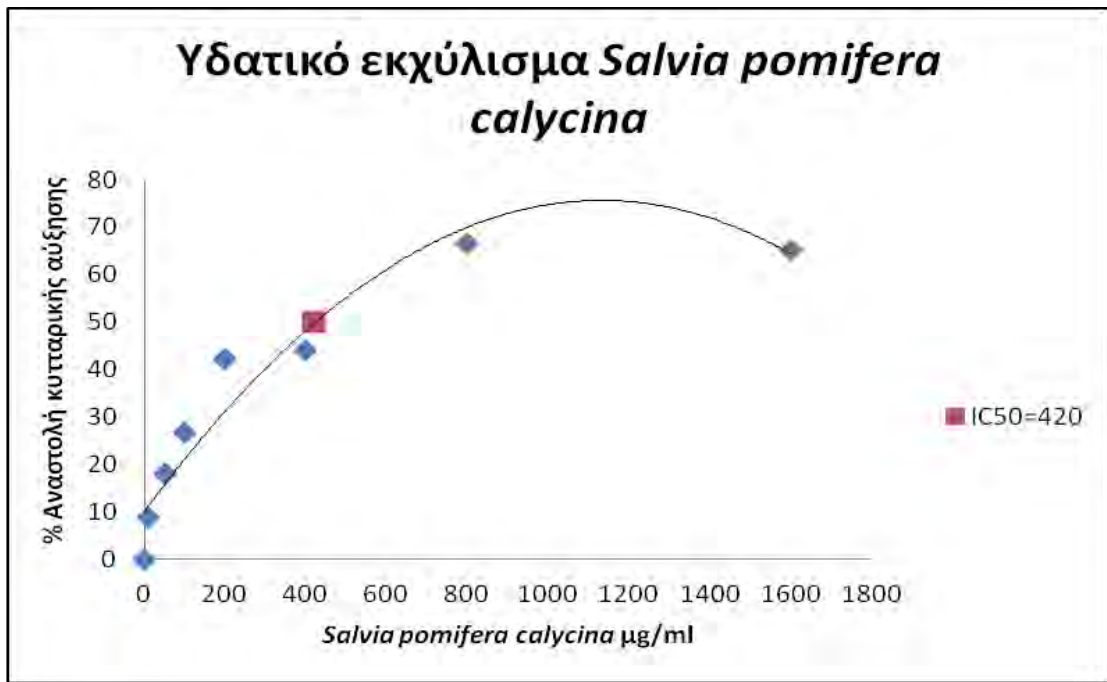
Γράφημα 1: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia fruticosa*



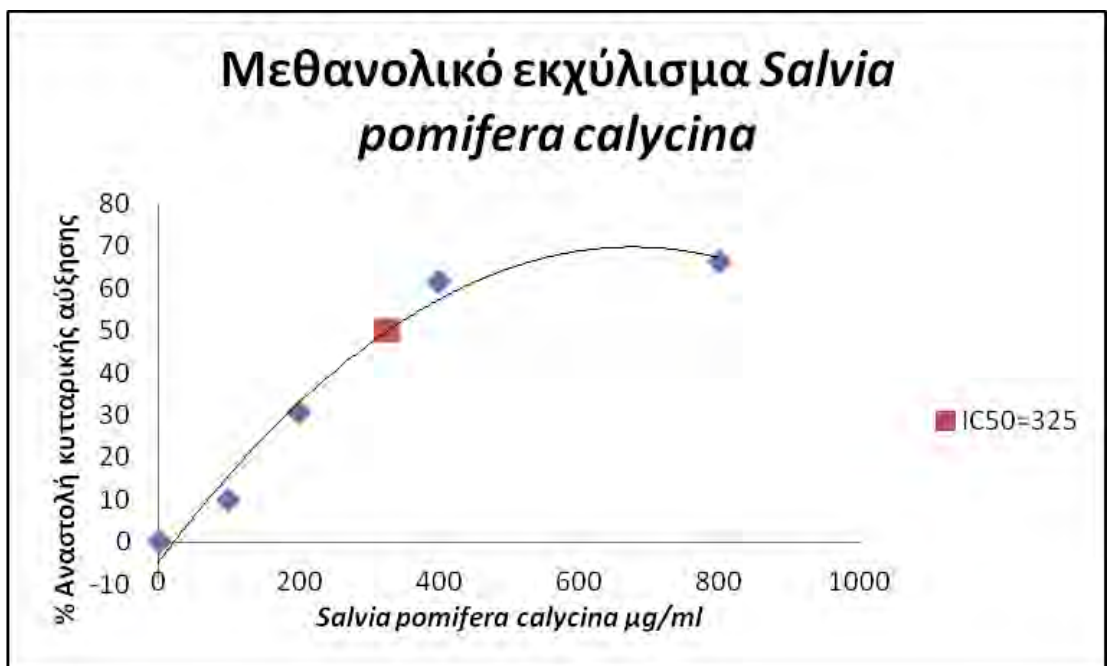
Γράφημα 2: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*



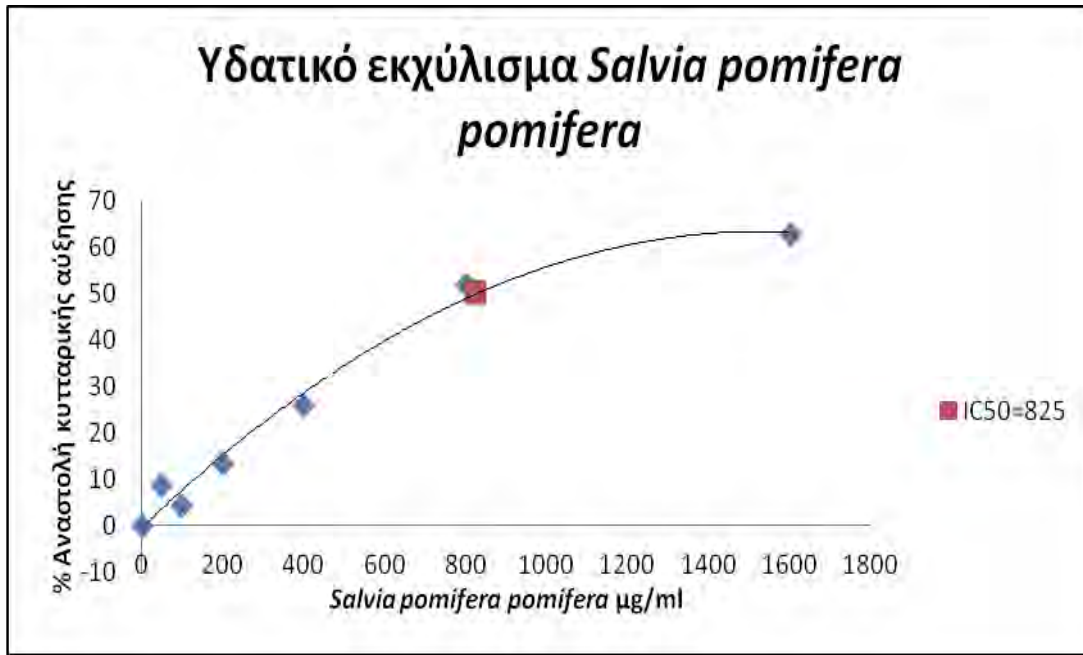
Γράφημα 3: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis*



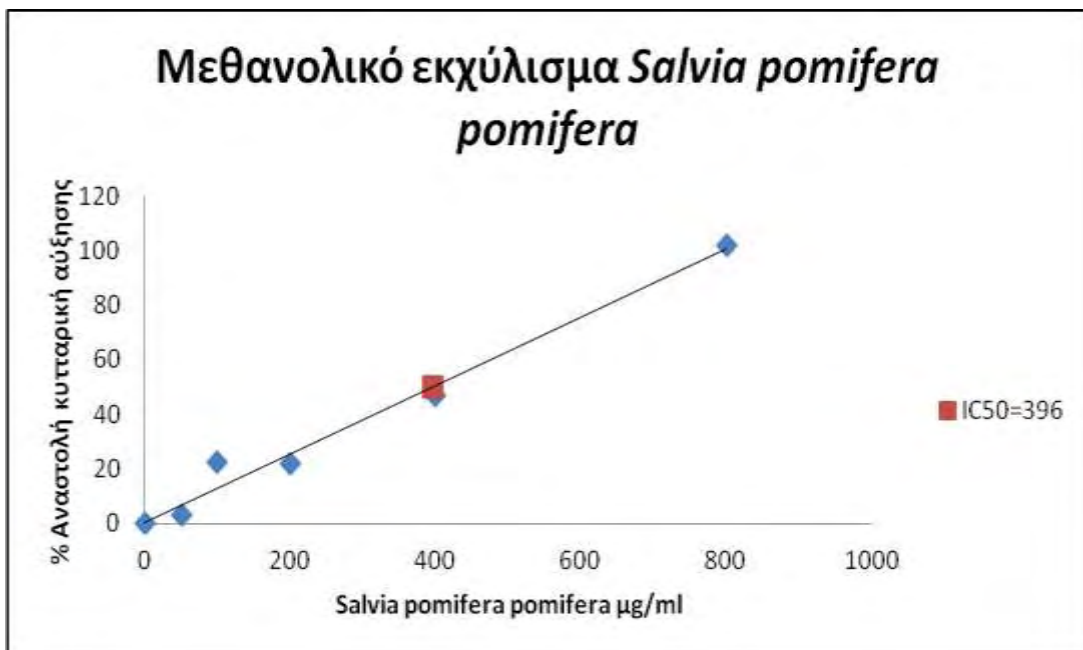
Γράφημα 4: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calycina*



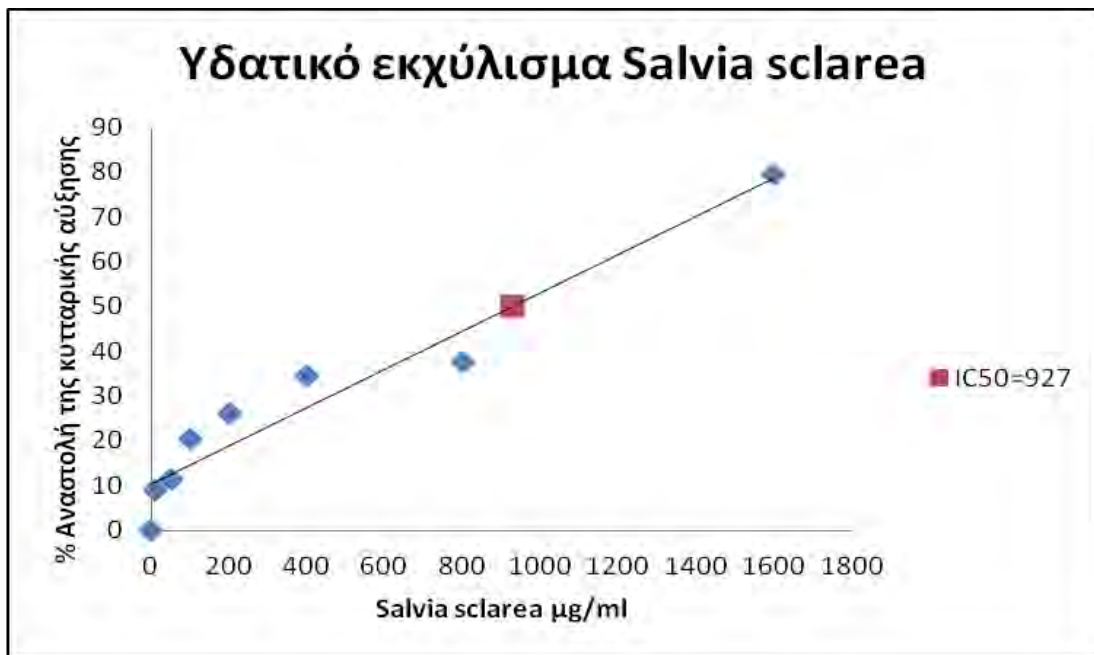
Γράφημα 5: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera calycina*



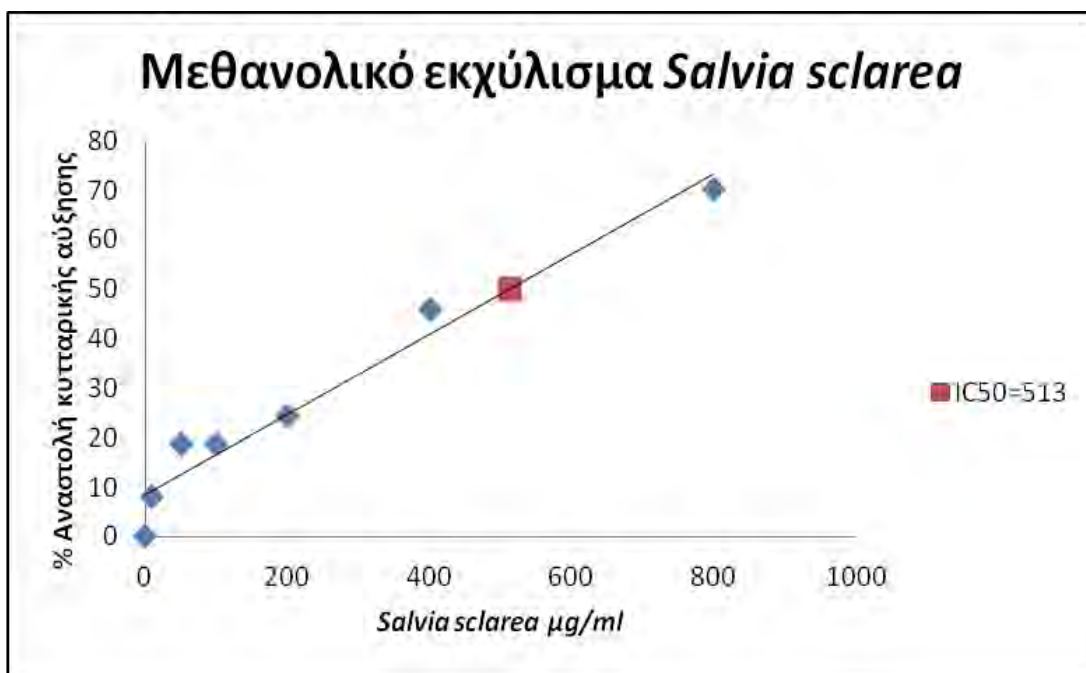
Γράφημα 6: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*



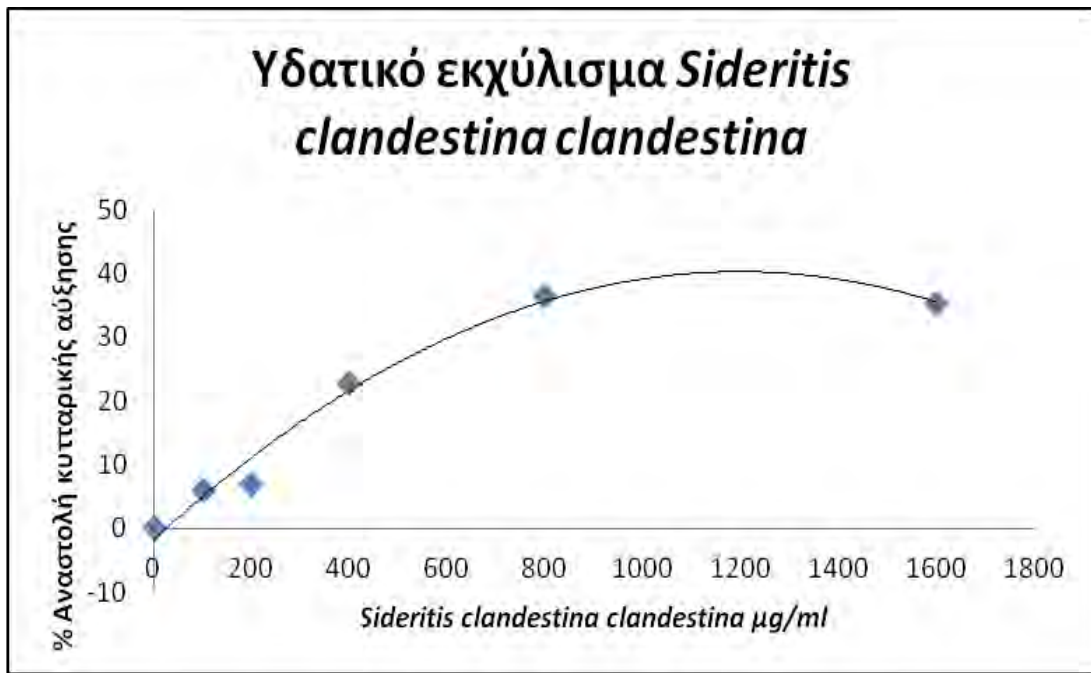
Γράφημα 7: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia pomifera pomifera*



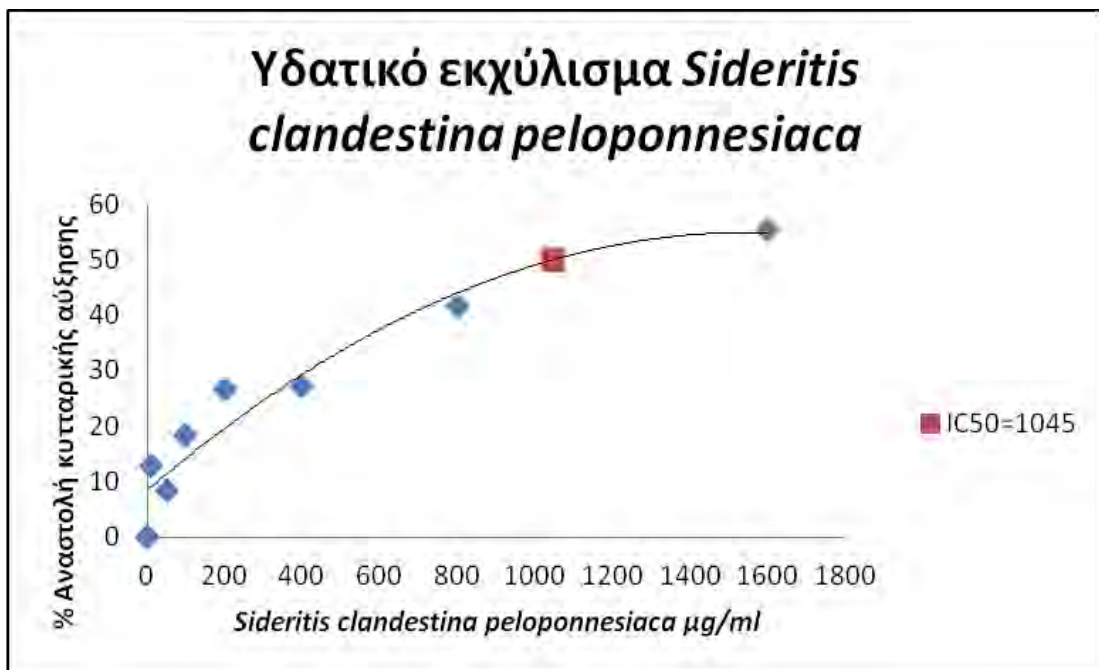
Γράφημα 8: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*



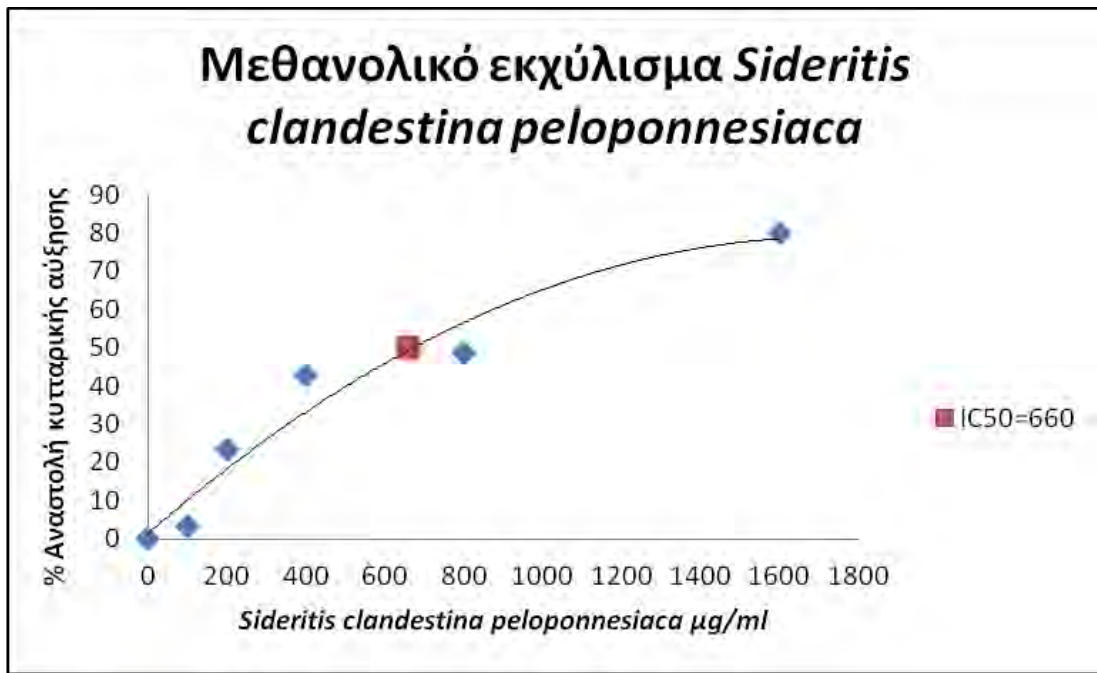
Γράφημα 9: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia sclarea*



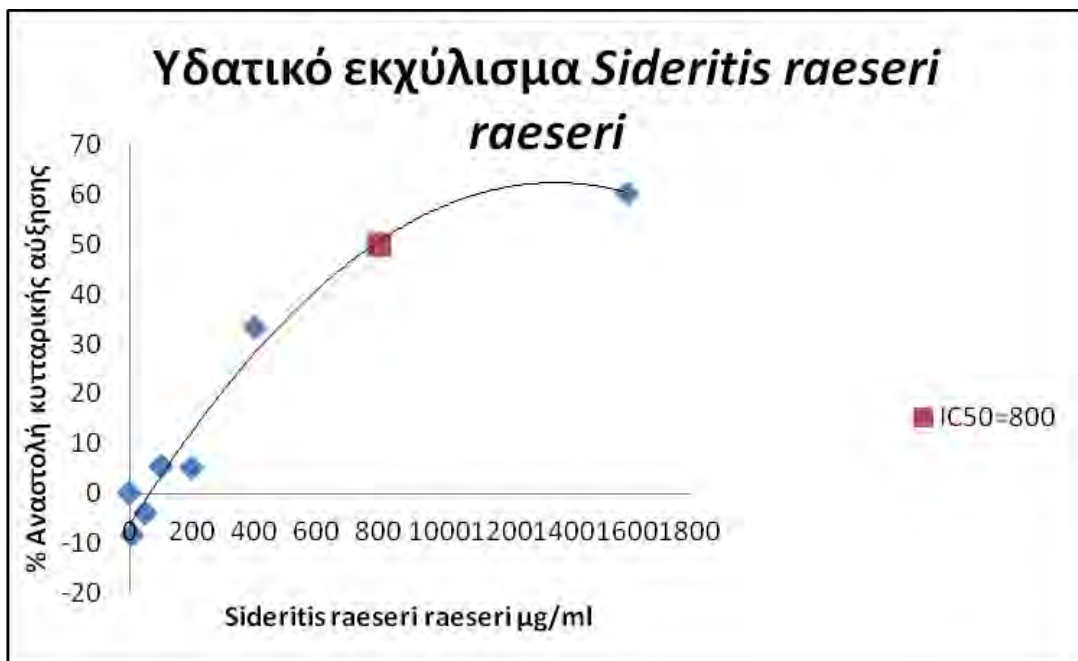
Γράφημα 10: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestina*



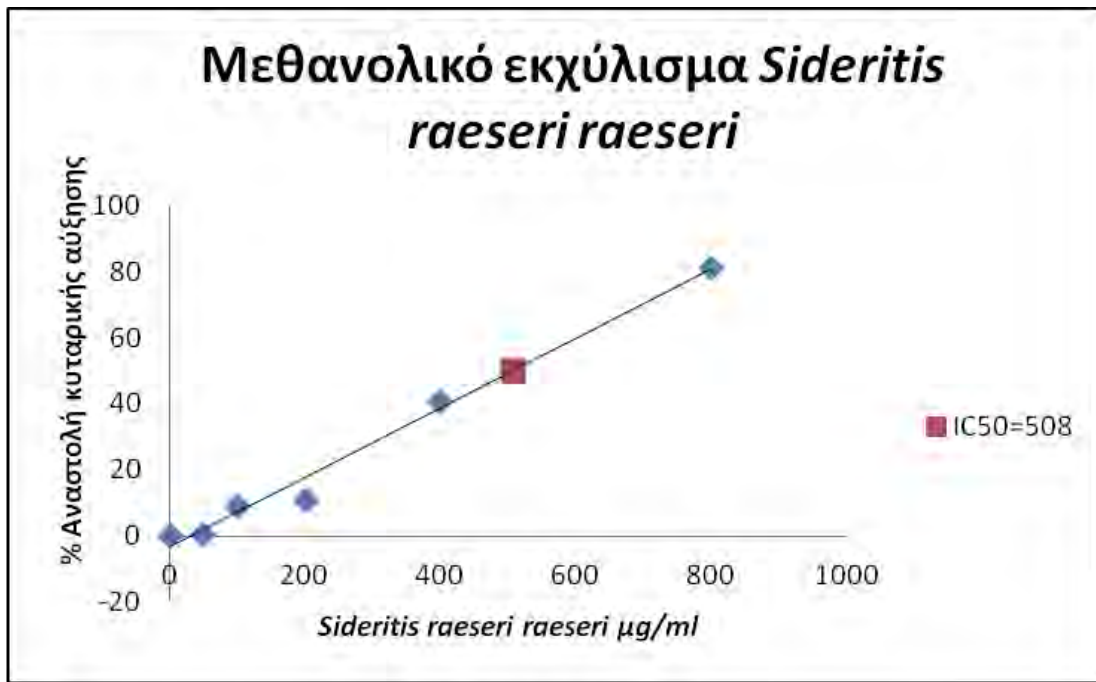
Γράφημα 11: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloponnesiaca*



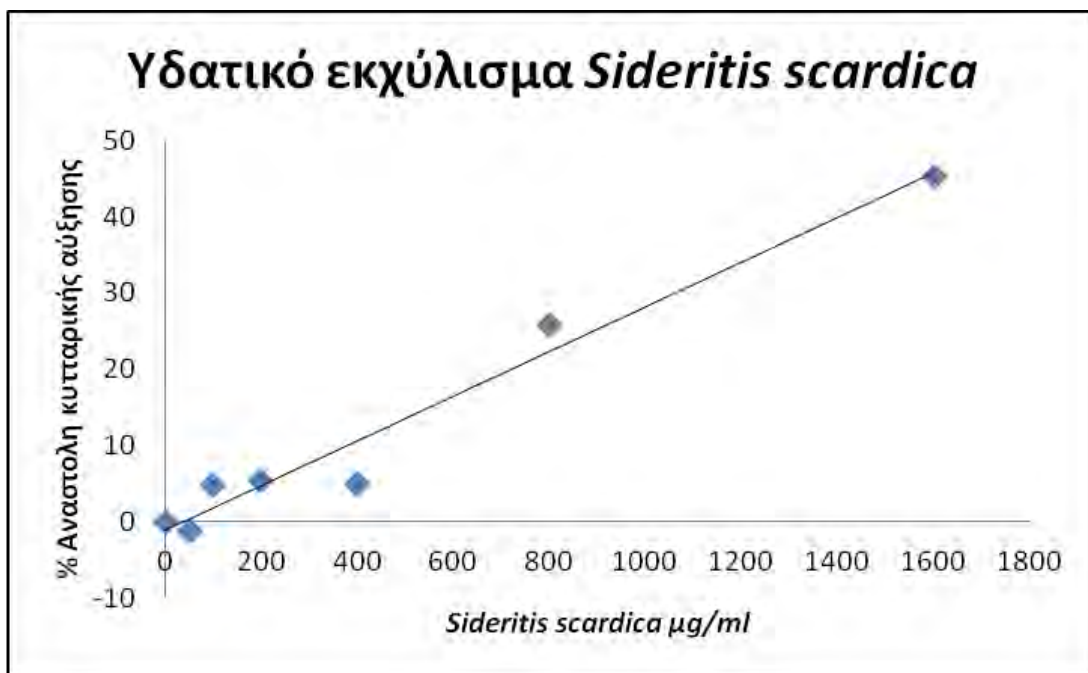
Γράφημα 12: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina peloronnesiaca*



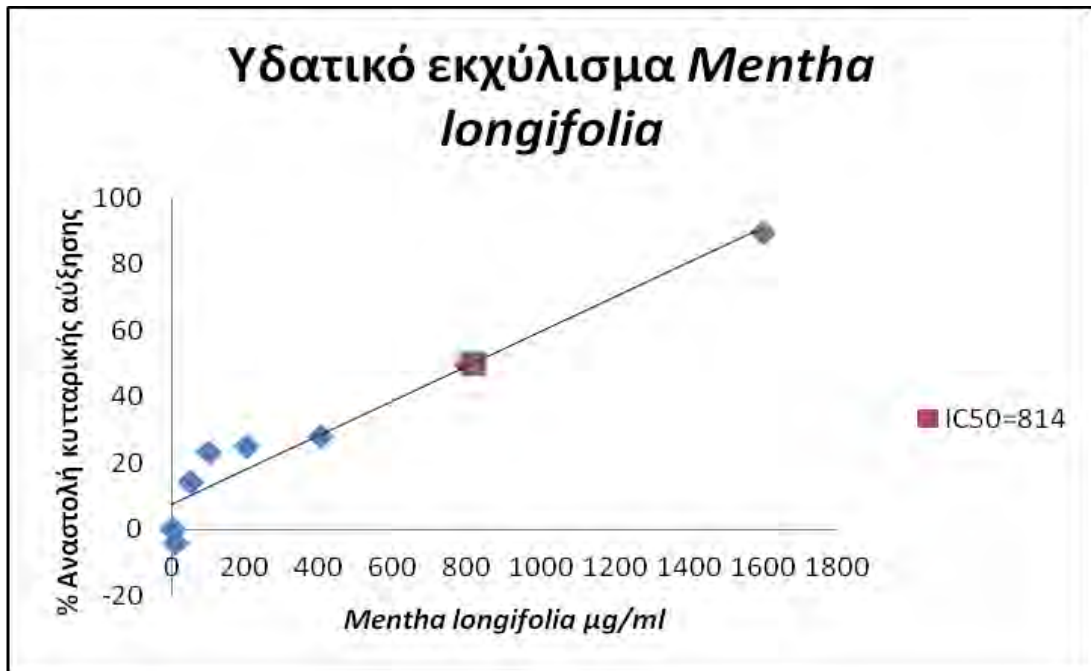
Γράφημα 13: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*



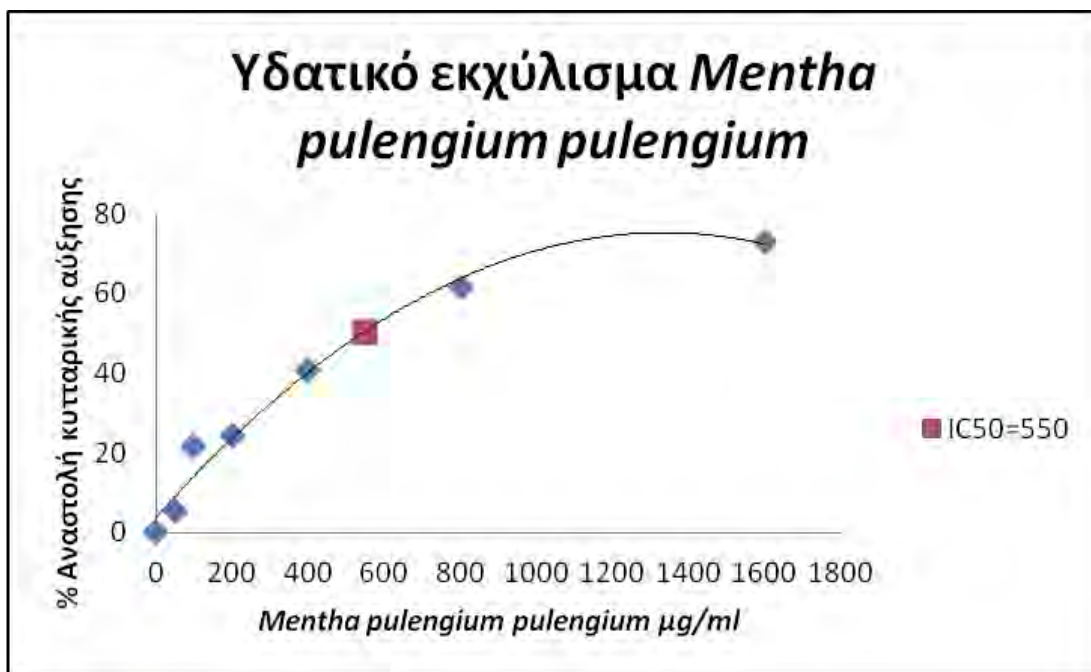
Γράφημα 14: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri*



Γράφημα 15: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*

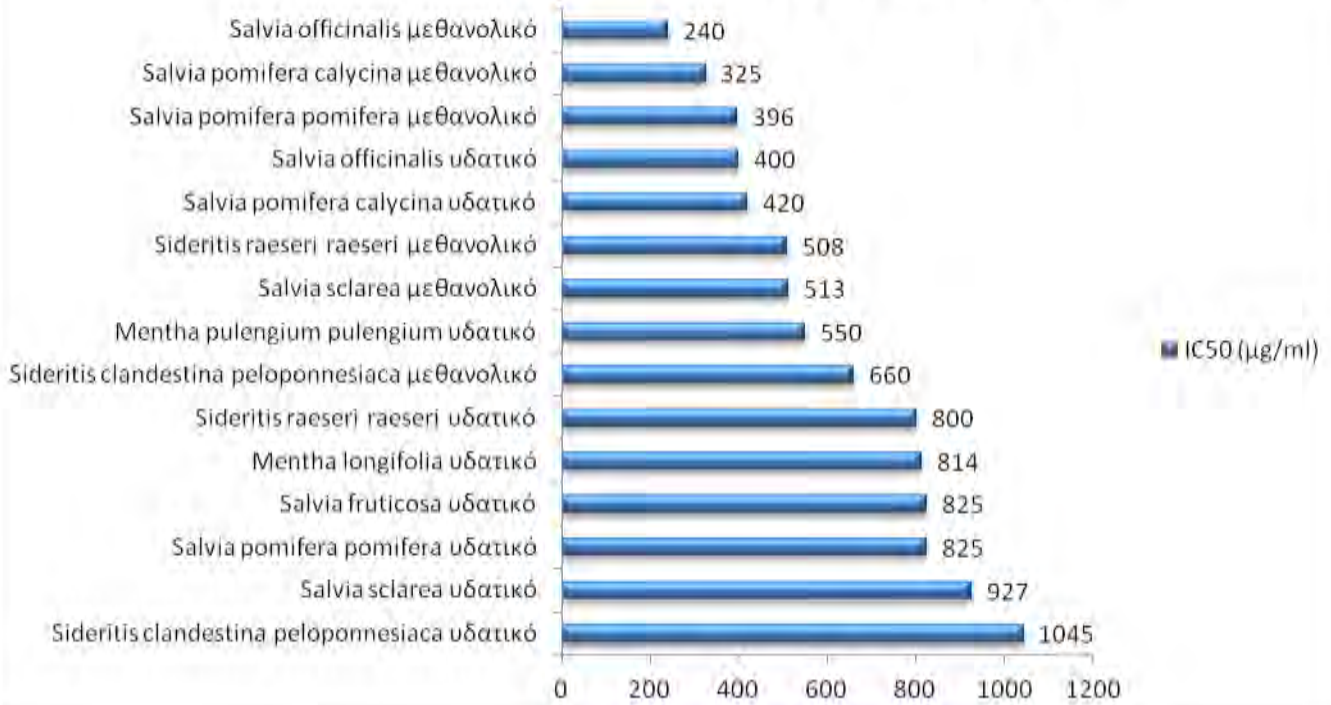


Γράφημα 16: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Mentha longifolia*

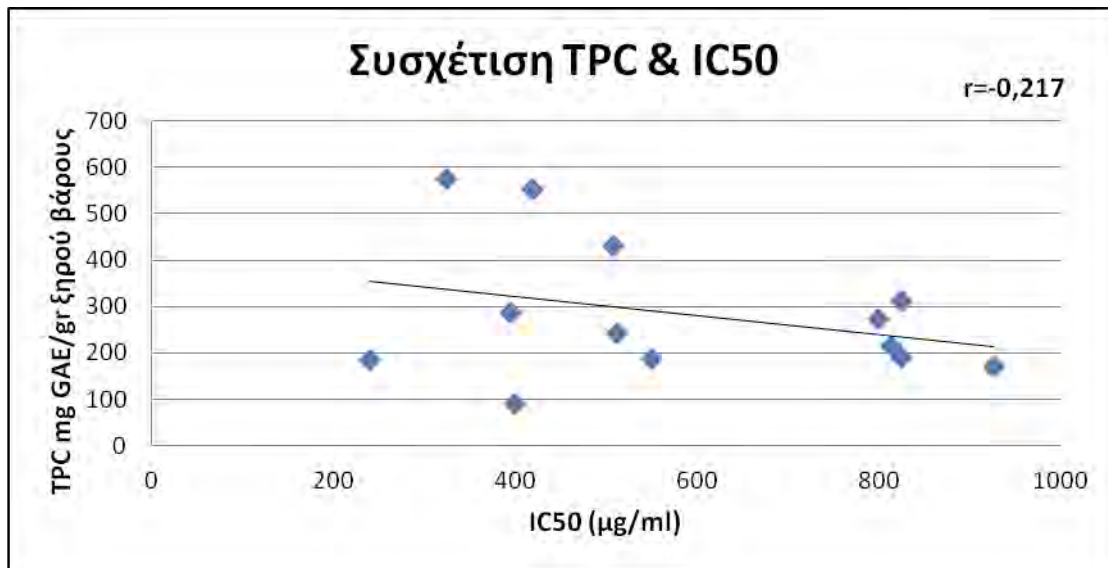


Γράφημα 17: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Mentha pulengium pulengium*

Συγκεντρωτικός Πίνακας των τιμών IC₅₀



Γράφημα 18: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀. Σημειώνεται ότι στο διάγραμμα δεν απεικονίζονται το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestina* και το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica*, καθώς όπως αναφέρθηκε δεν παρουσίασαν IC₅₀ στο εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν (10-1600μg/mL). Το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis clandestina clandestina* και το υδατικό εκχύλισμα του *Sideritis scardica* εμφάνισαν αντίστοιχα μέγιστη τιμή αναστολής 35% και 45% στα 1600 μg/mL.



Γράφημα 19: Συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC_{50} και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισής του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του, όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιείται στην παρατηρούμενη πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσοτέρων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών. 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). 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 πολυφαινολών 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). Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα χυλάνθη, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. και φαίνεται να δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την μετάσταση (Bidlack et al., 2000).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων των γενών *Salvia*, *Sideritis* και *Mentha* στην αύξηση καρκινικών ηπατικών κυττάρων (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 17, που προέκυψαν, είτε με υδατική, είτε με μεθανολική εκχύλιση.

Αναλυτικότερα, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 9 εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά από είδη του γένους *Salvia* (*Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, *Salvia pomifera calycina*, *Salvia pomifera pomifera*, *Salvia sclarea*), και 6 εκχυλίσματα, μεθανολικά και υδατικά, από είδη του γένους *Sideritis* (*Sideritis clandestina clandestina*, *Sideritis clandestina peloponnesiaca*, *Sideritis raeseri raeseri*, *Sideritis scardica*) και 2 υδατικά εκχυλίσματα από το γένος *Mentha* (*Mentha longifolia* και *Mentha pulegium pulegium*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2, με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 240 έως 1045 μg/mL, επιβεβαιώνοντας τον χαρακτηρισμό τους σαν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες, εφόσον σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φυτικά εκχυλίσματα με τιμές IC₅₀ από 100-1000 μg/mL, εμφανίζουν αρκετά ισχυρή αντικαρκινική δράση. Μοναδικές εξαιρέσεις σε αυτό αποτελούν τα υδατικά εκχυλίσματα των ειδών *Sideritis scardica* και *Sideritis clandestina peloponnesiaca*, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μη πιθανοί ανασταλτικοί παράγοντες της αύξησης των καρκινικών κυττάρων σύμφωνα με τις τιμές IC₅₀ που παρουσίασαν (Gad-Shayne C, 2009).

Από όλα τα παραπάνω την πιο ισχυρή δράση (μικρότερη τιμή IC₅₀) εμφάνισαν, αρχίζοντας από το ισχυρότερο, τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ειδών: *Salvia officinalis* με τιμή IC₅₀=240μg/mL, *Salvia pomifera calycina* με τιμή IC₅₀=325μg/mL και *Salvia pomifera pomifera* με τιμή IC₅₀=396μg/mL. Ήταν χαρακτηριστικό πως τα εκχυλίσματα με την πιο ισχυρή δράση ήταν μεθανολικά και άρα ίσως σε μη πολικές ενώσεις οφείλεται η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι της αύξησης των HepG2 κυττάρων. Μεταξύ των εκχυλισμάτων του γένους *Salvia* ισχυρότερη αντικαρκινική ιδιότητα εμφάνισε το μεθανολικό εκχύλισμα του *Salvia officinalis* με IC₅₀=240μg/mL. Ενώ, αντίστοιχα, ανάμεσα στα φυτικά εκχυλίσματα των γενών *Sideritis* και *Mentha* μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση εμφάνισαν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri raeseri* με τιμή IC₅₀=508μg/mL και το *Mentha pulengium pulengium* με τιμή IC₅₀=550μg/mL αντιστοίχως. Η γενικότερη σειρά ισχύος των τριών γενών χειλανθών που εξετάστηκαν έχει ως εξής: ***Salvia*** (μ.ο IC₅₀ = 541,2μg/mL) > ***Mentha*** (μ.ο IC₅₀ = 682μg/mL) > ***Sideritis*** (μ.ο IC₅₀ = 753,25μg/mL). Σε αντίστοιχη μελέτη των ίδιων εκχυλισμάτων σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας (Hela), που εκπονήθηκε στο ίδιο εργαστήριο, παρατηρήθηκε ότι τα τρία ισχυρότερα εκχυλίσματα ήταν τα υδατικά *Salvia pomifera calycina* με τιμή IC₅₀ =

260μg/mL και *Mentha longifolia* με τιμή $IC_{50} = 287\mu\text{g/mL}$ καθώς και το μεθανολικό εκχύλισμα *Sideritis raeseri raeseri* με $IC_{50} = 300\mu\text{g/mL}$. Το εύρος των τιμών IC_{50} στην αναστολή των HeLa κυττάρων κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 110 – 1075 με γενικότερη σειρά ισχύος εκχυλισμάτων την: *Mentha* (μ.ο $IC_{50} = 353,3\mu\text{g/mL}$) > *Salvia* (μ.ο $IC_{50} = 461,1\mu\text{g/mL}$) > *Sideritis* (μ.ο $IC_{50} = 643\mu\text{g/mL}$). Ανάμεσα στα εκχυλίσματα του γένους *Salvia* σημαντικότερη αντικαρκινική δράση, στα HeLa κύτταρα, εμφάνιση το υδατικό *Salvia pomifera calycina* με $IC_{50} = 260\mu\text{g/mL}$, στο γένος *Sideritis* το μεθανολικό *Sideritis raeseri raeseri* με $IC_{50} = 300\mu\text{g/mL}$ και στο γένος *Mentha* το υδατικό εκχύλισμα *Mentha longifolia* με τιμή $IC_{50} = 287\mu\text{g/mL}$ (Κρεατσούλη Κ., 2012).

Όσον αφορά τη συσχέτιση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC) και των τιμών IC_{50} όπως φάνηκε από την ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman, οι δύο παράμετροι φαίνεται να μην έχουν άμεση σύνδεση μεταξύ τους, παρουσιάζοντας μία ελαφρώς αρνητική συσχέτιση, με τιμή συντελεστή συσχέτισης $r=-0,217$. Ωστόσο, οι περιπτώσεις του υδατικού και μεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia pomifera calycina*, αλλά και εκείνες των υδατικών εκχυλίσματων *Salvia sclarea* και *Salvia fruticosa* φαίνεται να αποτελούν εξαίρεση, καθώς τα δύο πρώτα εκχυλίσματα εμφανίζουν χαμηλή τιμή IC_{50} σε συνδυασμό με υψηλό συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC), και τα 2 δεύτερα υψηλό IC_{50} με χαμηλή τιμή TPC. Στην αντίστοιχη μελέτη στα HeLa κύτταρα και πάλι παρατηρήθηκε έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των τιμών IC_{50} και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με συντελεστή συσχέτισης $r=-0,392$ και εξαιρέσεις τις περιπτώσεις των εκχυλισμάτων του μεθανολικού *Sideritis raeseri raeseri*, όπου παρατηρήθηκε υψηλό TPC και μικρό IC_{50} και στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος *Salvia sclarea*, όπου εμφανίστηκε μικρή τιμή TPC και μεγάλο IC_{50} (Κρεατσούλη Κ., 2012). Η απουσία συσχέτισης που παρατηρείται, ίσως αποδεικνύει πως καταλυτικότερο ρόλο στον καθορισμό της αντικαρκινικής δράσης των εκχυλισμάτων διαδραματίζει η ποιοτική και όχι η ποσοτική πολυφαινολική σύσταση. Επιπλέον, θα μπορούσε η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων φυτοχημικών ενώσεων εκτός των πολυφαινολών. Ίσως, ακόμη, να εμφανίζεται κάποιο είδος συνέργειας μεταξύ των υπαρχόντων πολυφαινολών και άλλων φυτοχημικών ενώσεων. Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια άλλη προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε ορισμένα από τα είδη των φυτικών εκχυλίσμάτων που μελετήθηκαν και στην παρούσα εργασία, δείχθηκε ότι το συνολικό πολυφαινολικό φορτίο του κάθε είδους εμφανίζει πολύ μικρή συσχέτιση με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Stagos et al., 2012).

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως όλα τα εξετασθέντα εκχυλίσματα εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2, τέτοια ώστε να μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, με κατά μέσο όρο ισχυρότερα εκείνα του γένους *Salvia* και ασθενέστερα εκείνα του γένους *Sideritis*. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, η οποία έδειξε αναστολή της κυτταρικής αύξησης ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από τα 17 προαναφερθέντα φυτικά εκχυλίσματα του γένους *Salvia*, *Sideritis* και *Mentha*. Γενικότερα, μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με την ανασταλτική δράση εκχυλίσμάτων από τα εξεταζόμενα φυτικά είδη στην αύξηση καρκινικών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα άλλες μελέτες ασχολήθηκαν με:

- Ανασταλτική δράση αιθέριου έλαιου από το *Salvia officinalis* σε νεφρικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος ACHN, του προστάτη LNCaP, του μαστού MCF-7 και του αμελανωτικού μελανώματος C32. Στη μελέτη φάνηκε ότι το αιθέριο έλαιο του *Salvia officinalis* προκαλούσε μείωση της κυτταρικής αύξησης στα νεφρικά κύτταρα του αδενοκαρκινώματος ACHN όπου και παρουσιάστηκε τιμή 100% αναστολή στα 70 μg/ml. (Loizzo et al, 2007).
- Μεθανολικά εκχυλίσματα από *Mentha pulegium*. Εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα εντέρου Caco-2, ήπατος HepG2 και μαστού MCF-7 και παρουσίασαν τιμές IC₅₀ μεγαλύτερες από 75 μg/mL (Badisa R.B. et al, 2004).
- Υδατικά εκχυλίσματα από *Mentha longifolia*. Εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7) και του προστάτη (LNCaP) παρουσίασαν αντίστοιχα τιμές IC₅₀ 45,2 και 43,5 μg/mL (Abdullah I Hussain et al, 2010).
- Υδατικά εκχυλίσματα από *Salvia officinalis*. Εξετάστηκαν σε καρκινικά κύτταρα πλακώδους επιθηλίου HNSCC και εμφάνισαν τιμή IC₅₀ 135 μg/mL (Sertel S. et al, 2011).
- Υδατικά εκχυλίσματα *Salvia fruticosa* και *Salvia officinalis*. Εξετάστηκαν σε δύο τύπους κυττάρων ορθοκολικού καρκινώματος (CRC), HCT15 και

CO115, όπου φάνηκε ότι επάγουν την απόπτωση και στις δύο καρκινικές σειρές (Xavier, 2009).

Για την πρόοδο της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο απαιτείται η εξέταση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε σειρές φυσιολογικών κυττάρων. Επιπροσθέτως, καταλυτικός θεωρείται και ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που ευθύνονται για την αντικαρκινική ιδιότητα των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων. Τέλος, ιδιαίτερα χρήσιμες θα ήταν περαιτέρω έρευνες σε μοριακό επίπεδο για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού αναστολής της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

➤ Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Ανάσης Ε., «Τα φαρμακευτικά βότανα της Ελλάδας: ονομασία, ιστορία, βοτανικοί χαρακτήρες, χρησιμότητες, φαρμακευτικές ιδιότητες, καλλιέργεια», Μακρής, 1976.
- Βαρδαβάκη Μ., Καββαδά Δ., «Κλείδες προσδιορισμού των οικογενειών των αγγειοσπέρμων», Εκδόσεις Δ. Κ. Σαλονικίδης, 1994
- Θανασούλια Β., Σιατής Ν., «Περί βοτάνων: πλήρης οδηγός βοτάνων, μορφολογία, ιδιότητες, τρόποι χρήσης», Εκδόσεις Αγγελάκη, 2008.
- Καββαδάς Δ., «Εικονογραφημένο Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν», Αθήνα, 1958
- Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
- Κωνσταντίνου Α. Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου. Περιγαμινή-Ετήσια έκδοση του Πανεπιστημίου Κύπρου 2008.
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α. Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14, 1997
- Πιτακοίλη Δ., Τζάκου Ο., Κουλάδη Μ., «Χημικά συστατικά του γένους *Salvia*», 2009
- Πιταροκοίλη Δανάη. Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων ειδών *Salvia* που φύονται στην Ελλάδα και αντιμυκητιακές ιδιότητες αυτών. Μ.Δ.Ε. Αθήνα: 1999.
- Σκορίλας Ανδρέας. Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής. Αθήνα 2008.
- Σκουμπής Β., «Αρωματικά και Μελισσοτροφικά φυτά Ελλάδος», Εκδόσεις Αγρότυπος, 1998
- Σπανού Χρυσούλα. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών. 2010.
- Στάγκος Δημήτριος. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από ελληνικές ποικιλίες Αμπέλου (*Vitis Vinifera*), 2006.
- Χίου Α.Π., Φυτικοχημεία τροφίμων – Σημειώσεις Φροντιστηρίου, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, 2006

➤ 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
- ACS. Cancer Facts and Figures, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3
- Adlercreutz H, Mazur W., Phyto-oestrogens and Western diseases, Ann Med. 1997 29:95–120.

- Akdogan, M., Gultekin, F., Yontem, M. (2004), Effect of *Mentha piperita* (Labiatae) and *Mentha spicata* (Labiatae) on iron absorption in rats. *Toxicol Ind Health*; **20**(6-10), 119-22.
- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Chinou I.B., and Mitakou S., Gikas E. and Tsarbopoulos A., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 811-815.
- Alter, MJ (2007-05-07). "Epidemiology of hepatitis C virus infection." *World journal of gastroenterology : WJG* **13** (17): 2436–41.
- 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
- Barber J., Ortega J.F., Guerra A.S., Turner K.G., and Jansene R.K., Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23 (2002) 293–306.
- Bayrak, A., & Akgul, A. (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species. Phytochemistry*, 26, 846–847.
- 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.
- Bosch FX, Ribes J, Borràs J., Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):271-85.
- Bravo L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 1998; 56(11): 317-333.
- 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
- Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxì A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol.* 2001 Apr;34(4):593-602.
- Carper J., Καρύδη. K., «Τα βότανα είναι θαυματουργά», Εκδόσεις Μοντέρνοι καιροί, 2004.
- Charami M.T., Lazari D., Karioti A., Skaltsa H., Hadjipavlou-Litina D., and Souleles C., Antioxidant and Antiinflammatory Activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *Perfoliata* (Lamiaceae), *Phytother. Res.* 22 (2008) 450–454.

- Chen XH, Zhang BH, Yin X, Qiu SJ, Fan J, Ren ZG, Xia JL, Wang YH, Ye SL, Gan YH. [Effect of postoperative adjuvant transarterial chemoembolization upon early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010 Mar 30;90(12):826-9. Chinese.
- Cheng, W; S. Govindarajan, A Redeker (feb 1992). "Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease". *Liver International* **12** (1): 42–45
- Cheynier V., Polyphenols in foods are more complex than often thought, *Am.J. Clin. Nutr.*2005; 81(1): 223S-229S.
- Chien-Jen Chen; Hwai-I. Yang; Jun Su; Chin-Lan Jen; San-Lin You; Sheng-Nan Lu; Guan-Tarn Huang; Uchenna H. Iloeje, (2006). "Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level". *JAMA* **295** (1): pp. 65–73.
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y., Tannins and human health: dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998; 79(3): 362-372.
- Clebsch Betsy, Carol D. Barner (2003). *The New Book of Salvias*. Timber Press. p. 18.
- Crozier A., Burns J., Azis A.A., Stewart A.J., Rabiasz H.S., Jenkins G.I., Edwards C.A., Lean M., Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability, *Biological Research*.2000; 33(2).
- 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..
- De Flora S, Ramel C: Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) *Basic Life Sci*, 52: 461-462
- 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.
- Dig Liver Dis. 2010 Jul;42 Suppl 3:S206-14.
- Duke J., *Handbook of Medicine Herbs*, CRC Press, 2002.
- Duke J., Ζγουλέτα Ζ., «Το πράσινο φαρμακείο: βοτανοθεραπείες», Εκδόσεις Ψύχαλου, 2006.

- Ebara M, Ohto M, Sugiura N, Kita K, Yoshikawa M, Okuda K, Kondo F, Kondo Y., Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto SI, Dono K, Nakamori S, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M. Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by posthepatectomy liver failure. *Dig Dis Sci.* 2000 Jul;45(7):1383-8.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S27-34.
- Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? *Ann Surg.* 2002 Nov;236(5):602-11.
- Fialkow PJ : Clonal origin of human tumors, 1979, *Annu Rev Med*, 30: 135-143
- Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, *Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki*, 16: 183-184
- Fokialakis N., Kalpoutzakis E., Tekwani B.L., Khan S.I., Kobaisy M., Skaltsounis A.L., Duke O., Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete, *J. Nat. Med.*, 61 (2007) 38–45.
- Gad-Shayne C, 2009, Alternatives to in vivo studies in toxicology, in *General and Applied Toxicology*, Vol. 6. John Wiley & Sons Inc.
- Gerritsen M.E., Carley W.W., Ranges G.E., Shen C.P., Phan S.A., Ligon G.F., Perry C.A., Flavonoids inhibit cytokine induced endothelial cell adhesion protein gene expression, *Am. J. Pathol.* 1995; 147: 278-292.
- Gonzalez-Burgos E., Carretero M.E., Gomez-Serranillos M.P., Sideritis spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities A Review, *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (2011) 209–225.
- 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
- Halliwell B., Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept, *Nutr. Rev.* 1999; 57: 104-113.
- Han X., Shen T., Lou H., Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci.* 2007; 8: 950-988.
- Harborne J.B., Plant Phenolics, In Bell E.A. & Charlwood B.V. (Eds.), *Encyclopedia of plant physiology*, Volyme 8, Secondary Plant Products, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. 1980, pp: 329-395.
- Harborne J.B., *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London, 1993
- 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.
- Harvorne JB: *Methods in plant biochemistry*, I: Plant phenolics, London: Academic Press, 1989
- Hashem B. El-Serag, M.D., M.P_.H., Hepatocellular Carcinoma, *N.Emg/ J Med* 2011; 365:1118-1127 (2011).

- Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R and Yuspa SH : 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.
- Horgan AM, Dawson LA, Swaminath A, Knox JJ. Sorafenib and Radiation Therapy for the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. J Gastrointest Cancer. 2010 Aug 4.
- 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.
- Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model. Cancer. 1991 Nov 15;68(10):2150-4.
- Jaffe LF. (2003). "Epigenetic theories of cancer initiation." Advances in cancer research. Advances in Cancer Research 90: 209–30.
- Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. Cancer. 1992 70:977s-982s
- Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, Jpn J Physiol, 35: 693-707
- Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, Iijima A, Urushihara A, Kiyosawa K, Okuda M, Hino K, Okita K. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. Hepatology. 1998 May;27(5):1394-402.
- Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention. Vol e. Humana Press, 2005.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC: Mechanistic considerations in chemopreventive drug development (1994) J Cell Biochem (Suppl) 20: 1024
- 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.
- Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol Ther. 1998 78:167-209.
- Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA and Elliott BE : Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: Induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment, 1984, J Cell Physiol, 3: 87-97
- Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E “Herbs of the Labiatae” Elsevier Science Ltd, 2004.

- Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC and Cavenee WK : 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.
- Lambert J.D., Hong J., Yanf G., Liao J., Yang C.S., Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigation, American Journal of Clinical Nutrition. 2005; 81(1): 284S-291S.
- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. Toxicol Appl Pharmacol., 203(2):124–131, 2005.
- 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.
- Loewenstein WR : Junctional intercellular communication and the control of growth, 1979, Biochim Biophys Acta, 560: 1-65
- Loizzo, Monica Rosa, Tundis Rosa, Menichini Federica, Saab Antoine Mikael, Statti Giancarlo Antonio, Mennichini Francesco, Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models, 2007
- López-Lázaro M. (2010). "A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy". Molecular medicine 16 (3–4): 144–153.
- 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.
- Marx J: Many gene changes found in cancer, 1989, Science, 246: 1386-1388
- Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, & Sakurai, H. ,1995, Active oxygen scavenging activity of plant extracts. Biological and Pharmacological Bulletin, 18(1), 162–166.
- Menghini L, Massarelli P, Bruni G, Menghini 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.
- Moriwaki H. Prevention of liver cancer: basic and clinical aspects Exp Mol Med. 2002 Nov 30;34(5):319-25.

- Morse MA, Stoner GC: Cancer chemoprevention: principles and prospects. (1993) *Carcinogenesis*, 14:1737-1746
- Muldoon M.F. & Kritchevsky S.B., Flavonoids and heart disease, *Brit. Med. J.* 1996; 312: 458-459.
- Nagasue N, Yamanoi A, el-Assal ON, Ohmori H, Tachibana M, Kimoto T, Kohno H. Major compared with limited hepatic resection for hepatocellular carcinoma without underlying cirrhosis: a retrospective analysis. *Eur J Surg.* 1999 Jul;165(7):638-46.
- Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, *Cancer Res*, 47: 1473-1487
- Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma.
- Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2006 Aug 28;240(2):157-69. Epub 2005 Oct 17. Review.
- 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.
- Parkar S.G., Stevenson D.E., Skinner M.A., The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health, *International Journal of Food Microbiology.* 2008; 124(3): 295-298.
- Parkin D.M., Bray F.I., Devesa S.S., Cancer burden in the year 2000. The global picture., *European Journal of Cancer* September 2001.
- Percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. Study of 95 patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 1990 Nov-Dec;5(6):616-26.
- 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.
- Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J.
- Potter VR : Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: an examination of the Solt-Farber protocol, 1984, *Cancer Res*, 44: 2733-2736
- Quattrocchi, Umberto, 1999, *CRC World dictionary of plant names: Common names, Scientific Names, Eponyms, Sonyonyms, and Etymology*, CRC Press.
- Rasnick D, Duesberg PH. (1999). "How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer" *The Biochemical journal* 340 (3): 621–30. DOI:10.1042/0264-6021:3400621. PMC1220292 PMID 10359645
- 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.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Antioxidant properties of phenolic compounds, *Plant Science.* 1997; 2(4): 152-159

- Robebtr L. Nussbaum Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard. "Thompson & Thompson Ιατρική Γενετική". Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης. 7^η Έκδοση. Αθήνα.2011
- 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 Southeasten European Countries, Chalkidiki, Greece, 29 Sept.-3 Oct., 2002.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M., Polyphenols: antioxidants and beyond, *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005a; 81(1): 217S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., *et al.*, Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005, 45, 287-306.
- Sertel S. ,Eichhorn T. ,Plinkert P.K. and Efferth T., 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, Nacz M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.
- 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.
- Slamenova D., Masterova I., Labaj J., Horvathova E., Kubala P., Jakubikova J., Wsolova L., Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis L.* on colonic and hepatic human cell cultured in vitro, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94: 282-290, 2004
- Smith JJ, Tully P, Padberg RM. Chemoprevention: A primary cancer preention 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.
- Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005 Oct;2(10):518-25.
- 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

- Stocker, P., M. Yousfi, O. Djerridane, J. Perrier, R. Amziani, S. El-Boustani and A. Moulin, 2004. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86: 919-925.
- 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.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathe G., Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine and Pharmacotheraph*. 2002; 56(4): 200-207.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000 80:1073–1080.
- Trosko JE, Chang CC and Medkalf A : Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, 1983, *Cancer Invest*, 1: 511-526
- Ulubelen A. Terpenoids in the Genus *Salvia* In: Sage, The genus *Salvia*, Ed. S. E. Kintzios, Harwood Academic Publishers, Luxembourg; 2000: 55-68.
- Urquiaga I. & Leighton F., Plant Polyphenol Antioxidants and oxidative stress, *Biol. Res*. 2000; 3(2)
- Van IJzendoorn, M. H., & DeWolff, M.S. (1997). In search of the absent father: Meta-analyses on infant-father attachment. A rejoinder to out discussants. *Child Development*, 63,840-858.
- Van IJzendoorn, M.H., Moran, G., Belsky, J., Pedersin, D., Bakermans-Kranenburg, M.J. & Kneppers, K. (2000). The similarity of siblings' attachments to their mothers. *Child Development*, 71, 1086-1098.
- Vente MA, Wondergem M, van der Tweel I, *et al* (April 2009). "Yttrium-90 microsphere radioembolization for the treatment of liver malignancies: a structured meta-analysis". *Eur Radiol* 19 (4): 951–9.
- Vermeris W, Nicholson R (2006) In *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer.
- Vinson J.A., Flavonoids in Foods as in Vitro and in Vivo Antioxidants, *Adv. Exp. Mes. Biol*. 1998; 439: 151-164.
- Vita J.A., Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *Am.j.Clin. Nitr*. 2005;81: 292S-2977S.
- 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.
- Wang, Xin W; S.Perwez Hussain, Teh-Ia Huo, Chuan-Ging Wu, Marshonna Forgues, Lorne J Hofseth, Christian Brechot and Curtis C Harris (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma". *Toxicology* 181-182: 43–47
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45:1-8.

- Wilkinson, ML; B Portmann, R Williams (1983). "Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper". *Gut* 24 (8): 767–771
- Xavier, Christina PR., Lima Cristovao F., Fernandes-Ferreira, Manuel, Pereora-Wilson, Cristina, *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway, 2009
- Yinrong Lu and L. Yeap Foo (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51:91-94.
- Zern T.L. & Fernandez M.L., Cardioprotective effects of dietary polyphenols, *J.Nutr.* 2005;135: 2291-2294.
- 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.