Losse nummers € 9,50

Nederlands Tijdschrift voor

Fytotherapie

werking en werkzaamheid van natuurproducten

Voorjaar 2013
26e jaargang, nr. 2

Medicinaal gebruik van keukenkruiden

Salie, rozemarijn en tijm

Farmaceutische activiteit van fenolen

Tijm en borstkanker

Peterselie, een psychogeen kruid?

Inhoud

Ten geleide: Keukenkruiden....2
N. Tode-Gottenbos en M.R. de Jong

Ontstekingsremmende werking van rozemarijn, salie en tijm....3
M.R. de Jong

Fenolengehalte en farmaceutische activiteit van culinaire kruiden en specerijen....9
M.R. de Jong

Effecten van *Thymus serpyllum*-extract op menselijke borstkankercellen....11
N. Tode-Gottenbos

Peterselie, garnering voor het zenuwstelsel?....16
G. van Elteren

Boekbespreking....17
S.B.A. Halkes

Vaste rubrieken
Agenda....1
NVF-nieuws....2, 10
Correcties en aanvullingen....20
Korte berichten....18

Illustraties
Voorkant, pag 9, 13 en 16: Evava.nl
Overige: Auteurs van de artikelen

WBP-verklaring
Indien u geen NVF-lid of NTvF-abonnee bent, ontvangt u deze editie van dit tijdschrift omdat u als relatie in onze database staat. Het NVF-bestuur vindt het belangrijk dat u op de hoogte wordt gehouden van onze activiteiten en van de ontwikkelingen die in deze editie beschreven staan. U ontvangt alle edities of incidenteel een editie van het NTvF gratis. De toezending kan onregelmatig zijn. Wilt u verzekerd zijn van tijdige toezending en/of de vereniging willen steunen dan vragen we u abonnee of lid te worden. Mocht u geen prijs stellen op deze toezending of wilt u helemaal uit ons bestand verwijderd worden, geef dit dan door aan het NVF-bureau (adres hierboven). De NVF stelt haar adressenbestand nooit ter beschikking van derden.

Agenda

15-18 mei 2013
36th Annual Meeting of the Society of Ethnobiology 'Climate Change and Ethnobiology'
Plaats: University of North Texas, Denton (TX), Verenigde Staten.
Informatie: http://ethnobiology.org/conference.

28-30 juni 2013
***11th International Herb Symposium* (hierbinnen ook het congres van de *Veterinary Botanical Medical Association*)**
Plaats: Wheaton College, Norton (MA), Verenigde Staten.
Informatie: www.vbma.org.

28 juni-3 juli 2013
54th Annual Meeting of the Society for Economic Botany
Plaats: Plymouth University, Plymouth, Verenigd Koninkrijk.
Informatie: http://cms.gogrid.econbot.org/SEBHome.html.

8-10 juli 2013
The XVII International Congress PHYTOPHARM 2013
Plaats: Diergeneeskundige Universiteit Wenen, Wenen, Oostenrijk.
Informatie: www.ipharm.sp.ru/Phyto13.

1-5 september 2013
***61th International Congress and Annual Meeting GA Society for Medicinal Plant and Natural Product Research* (inclusief een veterinair minisymposium)**
Plaats: Münster, Duitsland.
Informatie: www.ga2013.org.

9-11 september 2013
7th International Workshop on Anthocyanins
Plaats: Porto, Portugal.
Informatie: www.iwa2013.com.

Colofon

Het Nederlands Tijdschrift voor Fytotherapie (NTvF) wordt uitgegeven door de Nederlandse Vereniging voor Fytotherapie (NVF). Een abonnement kost per jaar (vier uitgaven) € 36,00 en is kosteloos voor leden van de NVF. Prijs buitenlands abonnement op aanvraag. Zie voor redactiestatuut en auteursrichtlijnen www.fyto.nl, onder Tijdschrift.
Redactie: drs. A.S. van der Aa, drs. A.G.M. van Asseldonk, dr. S.B.A. Halkes, M. de Jong MSc, drs. L.K. de Munck-Khoe, N. Tode-Gottenbos. Bureauredactie: S.F. des Tombe en M.N. Zijlstra.
NVF-bestuur: dr. C.J. Beukelman, dr. S.F.A.J. Horsten, drs. L.K. de Munck-Khoe, dr. M.T.I.W. Schüsler-van Hees.
Redactie- en administratieadres: NVF-bureau, Rijksstraatweg 158, 6573 DG Beek-Ubbergen. Tel. 024-6844301; fax 024-6843939; e-mail: nvf@fyto.nl; www.fyto.nl
ISSN 1384-8925
Advertentie-exploitatie: JN/Media Sales, Deventer. Tel. 0570-516873; e-mail: info@jnmediasales.nl
Druk: Oranje/van Loon, Den Haag
© NVF, 2013
Artikelen in het NTvF of gedeelten daarvan mogen uitsluitend na schriftelijke toestemming van de redactie worden overgenomen.

Ten geleide: kruiden in de keuken

In 1992 publiceerde het NTvF een artikel genaamd 'Wetenswaardigheden: een vluchtige farmacologie van kruiden en specerijen'. Aangezien culinaire kruiden door velen van ons dagelijks worden gebruikt, brengen we u in dit nummer op de hoogte van recente onderzoeken op dit terrein.

In dit nummer vindt u:

- *Een vertaalde samenvatting van een artikel over de relatie tussen de ontstekingsremmende en antioxidatieve kwaliteiten en het gehalte aan fenolen in de culinaire kruiden rozemarijn, salie en tijm. Interessant is dat de onderzoekers ook hebben gekeken naar het effect van (*in vitro-*)vertering op de eigenschappen van deze kruiden.*
- *Een vertaalde samenvatting van een studie verricht op Mauritius, die aansluit bij bovenstaand artikel. Deze studie richtte zich op de relatie tussen het totale fenolische gehalte, de antioxidantactiviteit en het vermogen van kruiden die aldaar veelvuldig gebruikt worden om de glycosylering van eiwitten te remmen. In deze studie wordt onderzoek gedaan naar knoflook, ui, gember, tijm, peterselie, kerrieblad, pepermunt, kurkuma, koriander, lente-ui en een kruidenmengsel dat traditioneel gebruikt wordt in gerechten. De studie geeft ook het belang aan van kruiden bij chronische ziekten als diabetes mellitus type II.*
- *Een bewerking van een artikel van Bozkurt* et al. *dat laat zien dat culinaire kruiden ook van belang kunnen zijn bij kanker. In dit artikel wordt het effect beschreven van tijmextract op proliferatie, apoptose en epigenetische veranderingen in mammacarcinoomcellen.*
- *Een artikel van Van Elteren waarin zij een andere kant van de culinaire kruiden beschrijft, namelijk de mogelijke psychogene effecten van peterselie.*
- *Een bespreking van het boek 'Mooi en fit door de wijndruivenpit' door Halkes. Ondanks het feit dat de druif niet als keukenkruid gebruikt wordt, is het wel een veelgebruikt voedingsmiddel en past het daarom in dit themanummer. Over het effect van druivenpitten op de gezondheid doen vele verhalen de ronde, sommige bewezen en andere (nog) niet.*

Naast deze artikelen vindt u de agenda en de korte berichten. In de korte berichten wordt aandacht besteed aan de nieuwe wetgeving omtrent het niet meer mogen vermelden van onbewezen gezondheidsclaims op producten omdat hier, voornamelijk bij het grotere publiek, veel verwarring over bestaat. Ook bleek de figuur op pagina 5 van het vorige nummer van dit tijdschrift onleesbaar geworden. In dit nummer vindt u een leesbare versie van deze figuur.

Wij wensen u veel plezier met het lezen van dit nummer.
Nienke Tode-Gottenbos en drs. Maaike de Jong, themacoördinatoren

---

NVF-nieuws

Nieuw project medicinale en gezonde planten(stoffen) bij de CAH Vilentum Dronten

In 2011 vormde het succesvolle gezamenlijke congres met de NVF (*Global opportunities for plants and health in the 21st century*) de afsluiting van het project 'Innovatieve Ketens voor Voeding en Gezondheid' van de CAH Vilentum Dronten en onderzoeksbedrijf Fytagoras. Beide partijen starten voorjaar 2013 met een tweede SIA-RAAK MKB project, genaamd '*Green Health* – de poort naar grootschalige ontwikkeling van plantaardige medicijnen en gezondheidspreparaten'. Behalve CAH Vilentum Dronten en Fytagoras zijn hierbij lectoraten van de Hogeschool Utrecht en de Hogeschool Arnhem-Nijmegen betrokken. Inhoudelijk levert ook het Pivot Park in Oss met hun *high throughput screening*-faciliteiten een belangrijke bijdrage aan dit project. Er participeren naast Nederlandse bedrijven enkele buitenlandse bedrijven. Ook de NVF maakt deel uit van het netwerk, dat in totaal 20 partners omvat. Uitgaande van de toenemende maatschappelijke behoefte en de vraag vanuit de sector en de industrie naar wetenschappelijk onderbouwde plantaardige preparaten voor preventie en genezing van aandoeningen is een aantal deelprojecten opgestart. Het leidend thema hierbij is obesitas. Naast de optimalisatie van teeltprotocollen voor medicinale planten concentreert dit project zich op het ontwikkelen van *in vivo* testen die nodig zijn om de stap naar marktintroductie van werkzaam gebleken planten(stoffen) te kunnen zetten.

Jubileumboek Federa

De Federa/Federatie Medisch Wetenschappelijke Verenigingen (Federa/FMWV) bestond in 2009 al 50 jaar. Wat begon als een jaarlijkse bijeenkomst van enkele biomedische wetenschappers groeide uit tot een koepel van vele (niet steeds dezelfde) verenigingen die gezamenlijk opkomen voor de belangen van medisch-wetenschappelijke onderzoekers. Hierbij was men gesprekspartner voor de overheid, bijvoorbeeld op het gebied van regelgeving voor het gebruik van lichaamsmateriaal. Aanpassingen van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek op mensen waren niet meer nodig dankzij de door de Federa/FMWV opgestelde regels voor zelfregulatie voor de omgang met lichaamsmateriaal. Ter bevordering van de interdisciplinaire samenwerking in het biomedisch onderzoek werden en worden jaarlijks goed bezochte medisch-wetenschappelijke dagen georganiseerd. De jaarlijkse prijs voor onderzoekers werd diverse keren uitgereikt aan een toekomstige Nobelprijswinnaar.
De NVF is vanaf 2001 lid van de Federa/FMWV. Recent verscheen het 376 pagina's dikke jubileumboek, waarin naast terugblikken en vooruitblikken van de Federa/FMWV een aantal verenigingen (waaronder de NVF) haar historie toelicht. De boeken zijn via de website van de Federa te bestellen (www.federa.org) en de prijs is € 35,- (NVF-leden € 30,-). Boekgegevens: Verhoef P, Coeberg JWW, Jacobs JJL. Vijftig jaar Federa (1959-2009); een beknopte geschiedenis en vooruitblik van de Federatie van Medisch Wetenschappelijke Verenigingen. Rotterdam, Erasmus Publishing / Federa. 2012. ISBN 978-90-5235-213-8.

Culinaire kruiden en hun ontstekingsremmende werking*

M.R. de Jong

*Dit artikel is een bewerkte vertaling van: Chohan M, Naughton DP, Jones L, Opara EI. An investigation of the relationship between the anti-inflammatory activity, polyphenolic content, and antioxidant activities of cooked and *in vitro* digested culinary herbs. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:627843.

Er is weinig onderzoek naar de invloed van het koken en de spijsvertering op de ontstekingsremmende werking van culinaire kruiden. Het doel van dit onderzoek was om deze werking te onderzoeken na koken en *in vitro*-vertering van algemene keukenkruiden, namelijk rozemarijn, salie en tijm, en de relatie tussen hun ontstekingsremmende activiteit, polyfenolgehalte en antioxidantactiviteit in kaart te brengen. De ontstekingsremmende activiteit van ongekookte (U), gekookte (C), gekookte en *in vitro* verteerde (C&D) en gestandaardiseerde (STD, 30 mg/ml) kruiden werd bepaald door het meten van hun effect op het vrijkomen van interleukine 8 (IL-8) uit gestimuleerde humane perifere bloedlymfocyten (PBL's) en Caco-2-cellen (getransformeerd humaan colon adenocarcinoom). Ook werd de antioxidantactiviteit (gemeten als de Trolox-Equivalent Antioxidant Capaciteit [TEAC]) en het geschatte totale fenolgehalte van de kruiden bepaald. Er bleek een significante afname in IL-8-afgifte door PBL's welke geïncubeerd waren met U, C, C&D en STD en vervolgens gestimuleerd waren met H_2O_2, en van Caco-2-cellen geïncubeerd met C&D en STD en gestimuleerd met TNFα. PBL's gepreïncubeerd met C&D vóór stimulatie (H_2O_2 of TNFα) leidde tot een significante remming in IL-8-afgifte. De significante correlaties tussen TEAC en het geschatte fenolgehalte en de ontstekingsremmende activiteit suggereren dat de polyfenolen mede een rol kunnen spelen bij de ontstekingsremmende activiteit van de onderzochte culinaire kruiden.

Introductie

Er is steeds meer bewijs dat culinaire kruiden in de context van voeding een gezondheidsbevorderende werking hebben. De polyfenolen blijken hier als algemene inhoudsstoffengroep een belangrijke rol in te spelen. Polyfenolen zijn belangrijke niet-nutritionele stoffen die voorkomen in veelgebruikte culinaire kruiden. Meerdere studies, zowel epidemiologische als experimentele, suggereren dat polyfenolen ontstekingsremmende en antioxidantactiviteit bezitten die kunnen bijdragen aan het voorkomen van chronische ziekten zoals kanker, cardiovasculaire ziekten, inflammatoire darmziekten en de ziekte van Alzheimer. Van enkele polyfenolen (koffiezuur, rozemarijnzuur) is bekend dat ze in aanzienlijke hoeveelheden aanwezig zijn in culinaire kruiden uit de familie van de *Labiatae*, waaronder rozemarijn, salie en tijm [1]. Van deze polyfenolen is aangetoond dat ze de ontstekingsreactie beïnvloeden door de werking van pro-inflammatoire cytokinen zoals IL-8 te remmen [2, 3]. Hun werkingsmechanisme is echter nog niet volledig opgehelderd.

Traditioneel gezien worden culinaire kruiden in kleine hoeveelheden gebruikt om de geur en smaak van voedsel te verbeteren. Ze worden om deze reden vaak meegekookt en worden beïnvloed door de vertering. Van de invloed van zowel koken als de vertering op de biologische eigenschappen is weinig bekend en daarom werd in deze studie de invloed van het koken en de *in vitro*-vertering op de ontstekingsremmende eigenschappen van rozemarijn, salie en tijm onderzocht om zo inzicht te krijgen in hun bijdrage aan de totale inname van polyfenolen en hun vermeende gezondheidsbevorderende eigenschappen.

Materiaal en methoden

Culinaire kruiden

Gedroogde en gecertificeerde biologische rozemarijn (*Rosmarinus officinalis*), salie (*Salvia officinalis*) en tijm (*Thymus vulgaris*) werden gekocht van Neal's Yard Remedies, Richmond, Surrey, Verenigd Koninkrijk, en luchtdicht en donker opgeslagen.

Voorbereiding van de monsters

Ongekookte monsters (U) werden bereid door kruiden (één gram) in donkere glazen flesjes gedurende 10 minuten te laten trekken in water (25 ml, 37°C) om ze vervolgens te filteren en te steriliseren (filtersterilisatie, poriegrootte 0,22 µm). De gemiddelde hoeveelheid droogextract werd geschat door het water uit deze extracten te laten verdampen en daarna de droogrest te wegen (rozemarijn (5,1 ± 0,4 mg/ml), salie (6,5 ± 0,7 mg/ml) en tijm (10,3 ± 0,1 mg/ml); n = 3).

Gekookte monsters (C) werden bereid door kruiden (één gram) te verwarmen in een Teflon koekenpan gedurende 10 minuten (zonder olie, aangezien oliën antioxidantactiviteit kunnen bezitten). Vervolgens werden de kruiden bereid zoals hierboven beschreven.

Gekookte en (*in vitro*) verteerde (C&D) monsters werden bereid zoals hierboven beschreven. De kruiden gingen vervolgens door een model van *in vitro*-vertering bestaande uit gesimuleerd speeksel [4] en gesimuleerde maag-en darmsappen [5, 6].

De pH van U, C en C&D werd gesteld op 6,0 ± 0,2 met zoutzuur (0,1 M) (om het effect van de pH op de oplosbaarheid en chelerende capaciteit van antioxidanten – via veranderingen in lading – te minimaliseren) en bewaard bij -80°C.

Uit voorbereidend onderzoek met de trypaanblauw-exclusietest bleek dat de controleverterings- en -C&D-monsters invloed hadden op de levensvatbaarheid van Caco-2-cellen. Omdat dit mogelijk veroorzaakt wordt door de spijsverteringsenzymen,werden deze gedeactiveerd door de reageerbuizen met de monsters vijf minuten in kokend water te plaatsen.

Om een beter begrip te krijgen van het effect van de voedingsmatrix op de vertering van polyfenolen in deze culinaire kruiden werd het effect van de vertering op rozemarijnzuur bekeken. Rozemarijnzuur (10 mg/ml oplossing in 10% (v/v) ethanol) werd verteerd middels hetzelfde *in vitro*-proces als hierboven beschreven. Uit praktische overweging werd er echter niet 10 minuten verhit in een Teflonkoekenpan. Vervolgens werd het vergeleken met onverteerd rozemarijnzuur (10mg/ml) waaraan evenveel gedestilleerd water was toegevoegd als er spijsverteringsenzymen waren toegevoegd aan de andere monsters.

Voorbereidende onderzoeken toonden aan dat de hoeveelheid droogextract in de verschillende monsters varieerde. Om deze reden werden gestandaardiseerde hoeveelheden droogextract (STD) bereid om het effect van dezelfde hoeveelheid extract van elk onderzocht kruid te beoordelen. Dit werd gedaan door het toevoegen van water (25 ml, gekookt) aan kruiden (één gram). Dit mengsel werd bereid zoals hierboven beschreven, waarna het verkregen droogextract werd gewogen en geresuspendeerd met steriel gedestilleerd water tot een eindconcentratie van 30 mg droogextract per ml. De pH werd vervolgens aangepast tot pH 6 ± 0,2 en de monsters werden opgeslagen (-80°C).

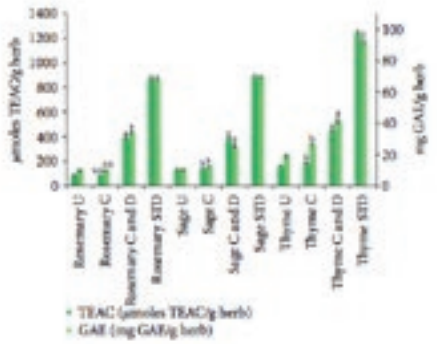
Bepaling van de antioxidantactiviteit en het geschatte fenolengehalte van de monsters
De antioxidantactiviteit van monsters U, C, C & D en STD werd bepaald met de ABTS-radicalen capaciteitstest. Trolox-standaarden, bereid in ethanol, werden verdund met fosfaatbuffer (0-20 µM) en getest met de monsters en controles, om de TEAC-waarde te bepalen. Galluszuurequivalenten (GAE's) werden bepaald voor de monsters U, C, C&D en STD met het Folin-Ciocalteu (FC) reagens zoals elders beschreven [7]. Omdat dit reagens ook een reactie aangaat met niet-fenolische verbindingen, met inbegrip van vitamine C, geeft deze test echter niet meer dan een goede schatting van het totale fenolengehalte. De waarden van deze test worden derhalve uitgedrukt als het geschatte totale fenolengehalte.

Weergave van data en statistische analyse
De data worden uitgedrukt als het gemiddelde ± SEM (n = 3 experimenten) tenzij anders vermeld. De antioxidantactiviteit wordt uitgedrukt in µmol TEAC/gram kruid en de schatting van het totale fenolengehalte in mg GAE/gram kruid. Variantie-analyse werd gebruikt om TEAC- en GAE-waarden van U-, C-, C&D- en STD-monsters te vergelijken. De onafhankelijke t-toets werd gebruikt om de TEAC-waarde van het verteerde en het onverteerde rozemarijnzuur te vergelijken. Het percentage remming van de IL-8-afgifte van PBL's of Caco-2-cellen werd bepaald met de volgende formule: ([IL-8-afgifte van betreffende controlecellen (gestimuleerd door H_2O_2 of TNFα) minus de IL-8-afgifte uit cellen gecoïncubeerd of gepreïncubeerd met monsters en H_2O_2 of TNFα]/IL-8-afgifte van betreffende controlecellen [gestimuleerd door H_2O_2 of TNFα]) ×100. De percentages voor IL-8-remming werden gecontroleerd op normaliteit met de Shapiro-Wilktest. Variantie-analyse werd vervolgens gebruikt om het percentage remming door U-, C-, C&D- en STD-monster na preïncubatie met H_2O_2 of TNFα te vergelijken met hun respectievelijke controles. Pearsons correlatiecoëfficiënt (r) met significantieniveau ($p \leq 0,05$) (tweezijdig) werd gebruikt om alle monsters te vergelijken.

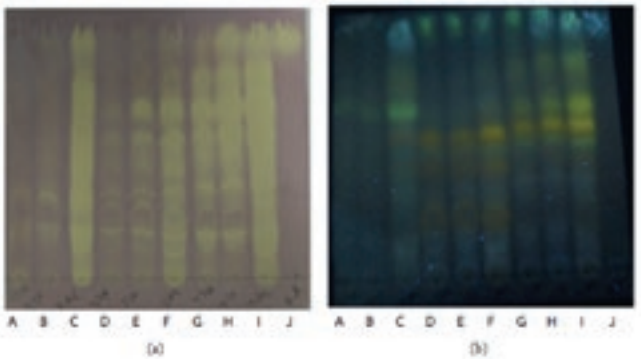
Resultaten

Antioxidantactiviteit en geschat totaal fenolengehalte
De antioxidantactiviteit (TEAC) en het geschatte totale fenolengehalte (GAE) van de C&D-monsters waren significant hoger dan die van de C-monsters ($p \leq 0,001$),welke weer significant hoger waren dan die van de U-monsters ($p \leq 0,05$), met uitzondering van rozemarijn ($p \geq 0,05$ voor zowel TEAC en GAE analyses) (figuur 1). De TEAC en de GAE voor de STD-monsters waren significant hoger dan U-, C-en C&D-monsters ($p \leq 0,001$) (figuur 1). Het STD-monster van tijm was hoger dan de STD-monsters van salie en rozemarijn voor beide analyses. Er was geen statistisch significant verschil in TEAC-waarden ($p = 0,692$) tussen onverteerd rozemarijnzuur (2901 ± 149,1 µmol TEAC/g) en verteerd rozemarijnzuur (2973,1 ± 140,6 µmol TEAC/g), ($n = 3$).

Antioxidantactiviteit en polyfenolanalyse middels dunnelaagchromatografie
Alle C&D-monsters op de dunnelaagchromatografische (DLC) platen bespoten met 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicaal gaven een gelere kleur dan de onverteerde U- en C-monsters. Dit verschil geeft aan dat C&D-monsters een hogere antioxidantactiviteit bezitten (figuur 2[a]). Bij de DLC-platen besproeid met natuurstof-reagens en polyethyleenglycol verschenen fenolzuren in de kleur blauw aan de bovenkant en andere polyfenolische verbindingen in de kleuren groen en geel in het midden van de platen (figuur 2(b)). De kleuren van de fenolzuren en de andere polyfenolverbindingen waren intenser bij de C&D-monsters in vergelijking met de U- en C-monsters, wat aangeeft dat de eerstgenoemde meer fenolische verbindingen bevatten. Voor C-kruiden bleek er geen verschil in kleurintensiteit voor rozemarijn, een marginale toename voor salie en een duidelijke toename voor tijm vergeleken bij de respectievelijke U-monsters (figuren 2[a] en 2[b]).



Figuur 1: Antioxidantactiviteit (TEAC) en totaal fenolengehalte (GAE) van de bewerkte kruidenmonsters. Data zijn gepresenteerd als de gemiddelden ± SD (n = 3). NS: geen significant verschil tussen rozemarijn (U) en rozemarijn (C) (p ? 0,05) en geen significant verschil tussen GEA rozemarijn (U) en rozemarijn (C) (p ? 0,05). [a]p ? 0,001 een significant verschil tussen C&D-monsters en U en C. [b]p ? 0,05 een significant verschil tussen monsters C en U. STD: gestandardiseerd monster (30 mg/ml).

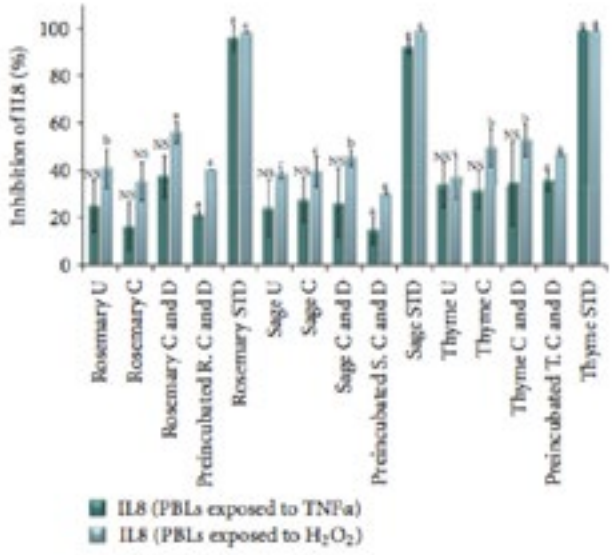


Figuur 2: Percentage remming van IL-8-afgifte door aan H_2O_2 of TNFα blootgestelde PBL's, gepre- of coïncubeerd met monsters. (a) DLC-plaat met monsters (5 µl, pH 6) en rozemarijnzuur (0,5 mg/ml) en bespoten met 2% DPPH. De gele gebieden corresponderen met de antioxidantactiviteit. A: rozemarijn (U), B: rozemarijn (C), C: rozemarijn (C&D), D: salie (U), E: salie (C), F: salie (C&D), G: tijm (U), H: tijm (C), I: tijm (C&D), J: rozemarijnzuur (U) ongekookt, (C) gekookt, (C&D) gekookt en verteerd. (b) DLC-plaat met monsters (5 µl, pH 6) en rozemarijnzuur (0,5 mg/ml) en bespoten met natuurstofagens en polyethyleenglycol. Fenolzuren verschijnen in verschillende kleuren blauw aan de bovenkant van de plaat en andere polyfenolen verschijnen in verschillende kleuren geel en groen in het midden van de plaat.

Celcytotoxiciteitstesten en catalase-achtige activiteit
De levensvatbaarheid van zowel PBL's als Caco-2-cellen blootgesteld aan U-, C-, C&D- en STD-monsters gedurende 24 uur was niet-significant verschillend van de levensvatbaarheid van de controles (p> 0,05, data niet getoond). Geen van de monsters liet catalase-achtige activiteit zien, wat aangeeft dat H_2O_2 niet werd geïnactiveerd door deze monsters.

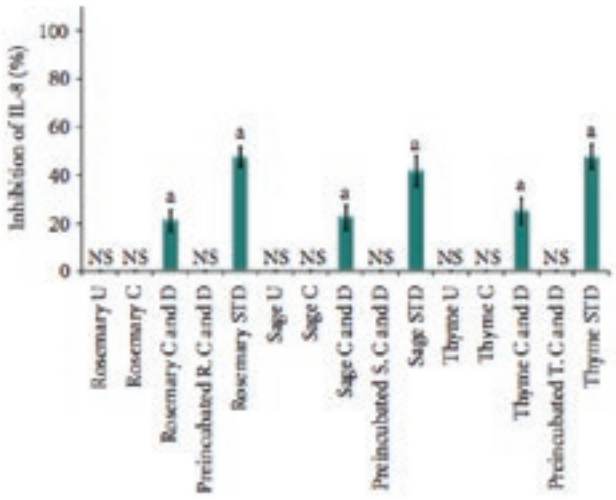
Spontane afgifte van IL-8 uit PBL's en Caco-2-cellen vergeleken met TNFα- en H_2O_2-gestimuleerde PBL's en Caco-2-controles
Spontane afgifte van IL-8 werd waargenomen voor zowel PBL's (855,5 ± 10,7 pg/ml, n = 8) als Caco-2-cellen (60,4 ± 1,1 pg/ml, n = 6). Blootstelling van cellen aan TNFα verhoogde de IL-8-afgifte significant vergeleken met de niet-gestimuleerde cellen (p ≤ 0,05) voor zowel PBL's (1011 ± 63,9 pg/ml, n = 6) als Caco-2 cellen (183 ± 14,5 pg/ml, n = 6). Blootstelling van cellen aan H_2O_2 verhoogdede IL-8-afgifte significant vergeleken met niet-gestimuleerde cellen (p ≤ 0,05) (PBL's 1144,6 ± 47,5 pg/ml, n = 6) (Caco-2-cellen 91,8 ± 8,2 pg/ml, n = 6). Geen van de monsters had een significant effect op spontane IL-8-afgifte van beide cellijnen.

Effect van coïncubatie van monsters met H_2O_2 of TNFα
Voor zowel U-, C- en C&D-monsters was er een daling in afgifte van IL-8 door PBL's, maar deze afname was slechts significant voor PBL's die gestimuleerd waren door H_2O_2 (p ≤ 0,05, figuur 3), met uitzondering van het C-monster voor rozemarijn. C&D-monsters verlaagden de afgifte van IL-8 door Caco-2-cellen gestimuleerd door TNFα significant (p ≤ 0,001, figuur 4). STD-monsters remden de afgifte van IL-8 door PBL's gestimuleerd door H_2O_2 en PBL's gestimuleerd door TNFα significant (p ≤ 0,001, figuur 3). STD-monsters verlaagden de afgifte van IL-8 door Caco-2-cellen gestimuleerd door TNFα significant (p ≤ 0,001, figuur 4). U-, C-, C&D- en STD-monsters hadden geen effect op IL-8 afgifte door Caco-2-cellen gestimuleerd door H_2O_2 (data niet getoond).



Figuur 3: Percentage remming van IL-8-afgifte door aan TNFα blootgestelde Caco-2-cellen, gepre- of coïncubeerd met monsters. Data zijn gepresenteerd als gemiddelde ± SEM (n = 3). Significante verschillen tussen IL-8-afgifte door controle PBL's en PBL's gepre- of coïncubeerd met monsters, ^{a}p ? 0,001, ^{b}p ? 0,01, ^{c}p ? 0,05, n = 3. NS: geen significant verschil tussen IL-8-afgifte door controle-PBL's in vergelijking met de met monsters gecoïncubeerde PBL's en H_2O_2 of TNFα, of met monsters gepreïncubeerde PBL's.

Effect van preïncubatie met monsters voorafgaand aan toevoegen van H_2O_2 of TNFα
Preïncubatie met C&D-monsters veroorzaakte een significante afname in IL-8-afgifte door PBL's gestimuleerd met H_2O_2 of TNFα (p ≤ 0,001, figuur 3). Preïncubatie van de Caco-2- cellen met C&D-monsters had geen effect op IL-8-afgifte als deze gestimuleerd werden door H_2O_2 of TNFα (figuur 4).



Figuur 4: Percentage remming van IL-8-afgifte door Caco-2-cellen blootgesteld aan TNFα gepre- of coïncubeerd met monsters. Data zijn gepresenteerd als gemiddelde ± SEM (n = 3). Significante verschillen tussen IL-8-afgifte door controle Caco-2-cellen en Caco-2-cellen gepre- of coïncubeerd met monsters, ^{a}p ? 0,001, ^{b}p ? 0,01, ^{c}p ? 0,05, n = 3. NS: geen significant verschil tussen IL-8-afgifte door controle Caco-2-cellen (TNFα) in vergelijking met de Caco-2-cellen gecoïncubeerd met monsters en TNFα, of met monsters gepreïncubeerde Caco-2-cellen.

Correlaties tussen antioxidantactiviteit, totaal fenolengehalte en ontstekingsremmende activiteit van de culinaire kruiden, ongeacht de behandelingen
Er was een sterk verband tussen TEAC en GAE (r = 0,989, p ≤ 0,01), (tabel 1) en tussen de procentuele afname in IL-8-afgifte veroorzaakt door monsters voor H_2O_2 of TNFα- gestimuleerde PBLs en het geschatte totale fenolengehalte en de antioxidantactiviteit (p ≤ 0,01, tabel 1). Er was een sterk en significant verband tussen de procentuele afname in IL-8- afgifte door TNFα-gestimuleerde Caco-2-cellen en het geschatte totale fenolengehalte en de antioxidantactiviteit (r = 0,892, p ≤ 0,01, tabel 1).

Discussie

De doelstellingen van deze studie waren ten eerste te onderzoeken welk effect het koken en de vertering (*in vitro)* hebben op de ontstekingsremmende activiteit van rozemarijn, salie en tijm. De tweede doelstelling was te onderzoeken of er een verband is tussen de ontstekingsremmende activiteit en de antioxidantactiviteit en het geschatte totale fenolengehalte van deze kruiden.

Op basis van de co-en preïncubatie-experimenten toont deze studie aan dat U-, C-, C&D- en STD-monsters van rozemarijn, salie en tijm IL-8-afgifte significant verlagen middels remming van en bescherming tegen de werking van H_2O_2 of TNFα. Het ontstekingsremmende effect van de kruiden op de PBL's was veel groter dan op de Caco-2-cellen. Het bleek dat, met uitzondering van C&D- en STD-kruiden in TNFα-gestimuleerde Caco-2-cellen, geen van de kruiden een ontstekingsremmende werking vertoonde gebaseerd op de remming van IL-8- afgifte voor zowel H_2O_2 of TNFα-gestimuleerde Caco-2-cellen. Deze verschillen zouden verklaard kunnen worden door het feit dat de Caco-2-cellijn een getransformeerd humaan colon-adenocarcinoom is terwijl de PB's volgroeide 'gezonde' lymfocyten zijn.

In de huidige studie verhoogde het koken van de kruiden het geschatte totale fenolengehalte of de antioxidantactiviteit niet altijd significant. Koken gevolgd door *in vitro*-vertering liet een significante toename in TEAC en GAE zien in vergelijking met de U- en C-kruiden. Andere studies die het effect van het koken op diverse plantaardige voedingsmiddelen hebben onderzocht, concludeerden dat de verschillen in polyfenolgehalte het gevolg zijn van zowel de voedingsmatrix als de gebruikte kooktechnieken [8]. Kijkend naar de literatuur over dit onderwerp blijkt dat het effect van *in vitro*-vertering op polyfenolen resulteerde in een vermindering van de activiteit in vruchtensappen en ofwel geen verandering ofwel een afname van de activiteit in kruidenthee [9]. Deze verschillen kunnen worden veroorzaakt door de aard (het hele kruid) maar ook door het *in vitro*-model van de vertering.

Analyse middels DLC toonde de aanwezigheid van fenolzuren en andere polyfenolen in de U-monsters die goed overeenkomt met de bestaande literatuur [10]. Uit de DLC-resultaten voor de *in vitro*-vertering bleek niet dat nieuwe verbindingen werden gevormd of verloren gingen ten gevolge van het koken,aangezien de profielen van de C- versus U-monsters identiek waren voor rozemarijn en iets intenser van kleur voor salie en tijm. De *in vitro*-vertering verhoogde de gehaltes van fenolzuren en polyfenolen. Deze waarnemingen worden ondersteund door de toename in de antioxidantactiviteit – zowel in de TEAC-test als bij de DLC-analyse – en het geschatte totale fenolengehalte. Rozemarijnzuur, gemeten via de TEAC- analyse, werd niet beïnvloed door *in vitro*-vertering. Hoewel het effect van koken op rozemarijnzuur niet onderzocht werd, suggereert het ontbreken van een verschil in TEAC en GAE inde C- en U-kruidenmonsters dat polyfenolen in deze kruiden (inclusief rozemarijnzuur, de belangrijkste fenolische component in deze kruiden) niet verminderd zijn als gevolg van de gebruikte bereidingswijze.

Een positief lineair verband is vastgesteld tussen polyfenolen en antioxidantactiviteit van kruiden. Er wordt gedacht dat polyfenolen het meest gevonden worden in de vacuolen van paravenale en parenchym-cellen onder de epidermis. Om deze reden wordt de stijging van de antioxidantactiviteit en het geschatte fenolengehalte waarschijnlijk veroorzaakt door de afbraak van de plantcelwanden via de *in vitro*-vertering, waardoor polyfenolen makkelijker vrijkomen. De antioxidantactiviteit, het geschatte totale fenolengehalte en de ontstekingsremmende effecten van STD-monsters waren veruit het grootste (tijm>salie, rozemarijn). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een grotere concentratie van plantenmateriaal (7,3 ± 2,4 mg/ml voor U- en 30mg/ml voor STD-monsters) en dus aan een hogere concentratie van polyfenolen, wat heeft geresulteerd in een dosisafhankelijke respons. Dit wordt verder ondersteund door de veel grotere afname in IL-8-afgifte bij gestimuleerde cellen (met uitzondering van H_2O_2 gestimuleerd Caco-2-cellen) die werden gecoïncubeerd met STD-monsters, wat bevestigde dat polyfenolen in belangrijke mate bijdragen aan de ontstekingsremmende eigenschappen van deze kruiden.

Tabel 1. Verband tussen antioxidantactiviteit, geschatte totale fenolen gehalte en procentuele afname in IL-8 afgifte, onafhankelijk van de behandeling.

Correlaties	r	p
GAE versus TEAC	0,989	≤ 0,01
procentuele afname in IL-8 voor PBL's blootgesteld aan TNFα versus GAE	0,914	≤ 0,01
procentuele afname in IL-8 voor PBL's blootgesteld aan TNFα versus TEAC	0,901	≤ 0,01
procentuele afname in IL-8 voor PBL's blootgesteld aan H_2O_2 versus GAE	0,922	≤ 0,01
Procentuele afname in IL-8 voor PBL's blootgesteld aan H_2O_2 versus TEAC	0,905	≤ 0,01
Procentuele afname in IL-8-afgifte voor Caco-2 blootgesteld aan TNFα versus GAE	0,876	≤ 0,01
Procentuele afname in IL-8-afgifte voor Caco-2 blootgesteld aan TNFα versus TEAC	0,892	≤ 0,01

Het werkingsmechanisme waarmee het effect van de kruiden op IL-8-afgifte te verklaren is, is onduidelijk. Er is echter gebleken dat polyfenolen een rol kunnen spelen bij de ontstekingsremmende activiteit zoals gerapporteerd in de huidige studie. De effectiviteit van rozemarijnzuur bij het verminderen van ontstekingen door remming van de pro-inflammatoire PKC/NF-κB-route is aangetoond in muizen [11]. Daarom kan gespeculeerd worden dat onder andere het rozemarijnzuur in de onderzochte kruiden verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de waargenomen remming van IL-8-afgifte. Daarnaast is uit onderzoek gebleken dat koffiezuur – een polyfenol dat ook wordt gevonden in de onderzochte kruiden [1] – zowel de door H_2O_2 als door TNFα gestimuleerde IL-8-afgiftein Caco-2-cellen remt [3]. Deze studie toonde aan dat remming zich op het transcriptionele en post-transcriptionele niveau voordeed.

Een duidelijk verschil dat in deze studie werd waargenomen, was de remming van IL-8-afgifte door PBL's gestimuleerd met H_2O_2, die over het algemeen groter (en significanter) was dan voor cellen die gestimuleerd waren met TNFα. Het zou zo kunnen zijn dat TNFα en H_2O_2 verschillende ontstekingsreacties beïnvloeden in de cellen, of dat ze dezelfde ontstekingsreacties op een andere manier beïnvloeden.

Het is onduidelijk waarom geen van de monsters de IL-8-afgifte van Caco-2-cellen blootgesteld aan H_2O_2 heeft geremd. Verschillen in H_2O_2- en TNFα-geïnduceerde afgifte van IL-8 zijn ook gerapporteerd voor koffiezuur [3]. De auteurs laten zien dat koffiezuur (2,0 mmol/l) de H_2O_2- en TNFα-geïnduceerde afgifte van IL-8 uit Caco-2-cellen kon remmen. Echter, terwijl is aangetoond dat de remming door koffiezuur veroorzaakt wordt via de remming van de expressie van IL-8-mRNA, onderdrukte het niet de TNFα-geïnduceerde verhoging van de IL-8-mRNA-expressie. Deze studie suggereert dat de mechanismen via welke de polyfenolen de stimulatie van IL-8-productie en het vrijkomen van IL-8 onderdrukken, zouden kunnen verschillen en afhankelijk zijn van depro-inflammatoire stimulus. Deze resultaten komen niet overeen met de huidige studie, waarin alleen TNFα-gestimuleerde IL-8-afgifte werd geremd door de monsters. Mogelijk zou het te maken kunnen hebben met de concentratie aan polyfenolen in een plant, welke wordt beïnvloed door tal van factoren zoals seizoenschommelingen en de plaats van herkomst, evenals directe verwerking na oogsten, opslag en koken [8].

De sterke en significante correlatie tussen het percentage remming van IL-8-afgifte door de gestimuleerde PBL's met TEAC en GAE suggereren dat er een verband is tussen de antioxidantactiviteit, polyfenolgehalte en de ontstekingsremmende werking van de onderzochte kruiden [3]. In combinatie met de literatuur betreffende de ontstekingsremmende activiteit van individuele polyfenolen geeft dit verband overtuigend bewijs dat de polyfenolen in deze kruiden een belangrijke bijdrage leveren aan de gerapporteerde remmende effecten op IL-8-afgifte. Het is echter niet duidelijk of dit effect op enige wijze veroorzaakt wordt door hun antioxidantactiviteit. Verder onderzoek is nodig om deze hypothese te bevestigen en om te verduidelijken welke polyfenolen (enmetabolieten) verantwoordelijk zijn voor de waargenomen activiteiten.

Dankzij het gebruik van de STD-monsters werd een dosisafhankelijke relatie tussen de hoeveelheid kruid en de ontstekingsremmende activiteit aangetoond. De dosis-responsrelatie is van bijzonder belang aangezien de hoeveelheid kruiden die in de bereiding van voedsel wordt gebruikt, varieert en daarnaast ook varieert tussen individuen. Een recente studie toonde aan dat de consumptie van kruiden en specerijen varieerde van 0,0 tot 10,0 g/persoon/dag [12].

Conclusie

Deze studie laat zien dat rozemarijn, salie en tijm, in hoeveelheden die worden gebruikt bij het koken, significante ontstekingsremmende activiteit bezitten, die kan worden toegeschreven aan de polyfenolen. Verder onderzoek is nodig om te verduidelijken welke polyfenolen verantwoordelijk zijn voor dit effect en het precieze werkingsmechanismen.

Auteursgegevens:

Drs. M.R. (Maaike) de Jong is naast natuurgeneeskundig arts met een BSc in fytotherapie ook docent medische basisvakken en docent fytotherapie en mederedacteur van dit tijdschrift.

Literatuur

1 Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, Du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database 2010;2010:bap024.

2 Huang SS, Zheng RL. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. Cancer Lett 2006;239(2):271-80.

3 Zhao Z, Hee SS, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-α-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. Journal of Agricultural and Food Chem 2008;56(10):3863-8.

4 Asano I, Hamaguchi K, Fujii S, Iino H. In vitro digestibility and fermentation of mannooligosaccharides from coffee mannan.Food Sci Technol Res 2003;9(1):62-6.

5 Glahn RP, Wien EM, Van Campen DR, Miller DD. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method forrapid estimation of iron bioavailability. J Nutr 1996;126(1):332-9.

6 Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ. Development ofan in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. J Agric Food Chem 1999;47(10):4301-9.

7 Singleton VL. Analytical fractionation of the phenolic substancesof grapes and wine and some practical uses of such analyses.Adv Chem 1974;137:184-211.

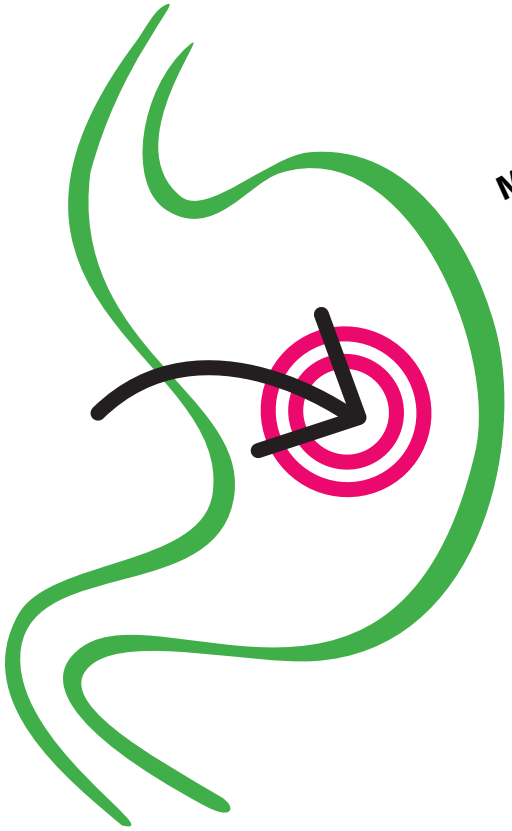
8 Mulinacci N, Ieri F, Giaccherini C, Innocenti M, Andrenelli L, Canova G, Saracchi M, Casiraghi MC. Effects of cooking on the anthocyanins, phenolic acids, glycoalkaloids, and resistant starch content in two pigmented cultivars of Solanum tuberrosum L. J Agric Food Chem 2009;56(24):11830-7.

9 Gião MS, Gomes S, Madureira AR, Faria A, Pestana D, Calhau C, Pintado ME, Azevedo I, Malcata FX. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. Food Chem 2011;131(3):761-7.

10 Wang H, Provan GJ,Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. Food Chem 2004;87(2):307-11.

11 Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. Carcinogenesis 2004;25(4):549-57.

12 Carlsen MH, Blomhoff R, Andersen LF. Intakes of culinary herbs and spices from a food frequency questionnaire evaluated against 28-days estimated records. NutrJ 2011;10(1):50.



Maagzuur

Misselijkheid

Vol gevoel

Maagpijn

Maagkrampen

Darmkrampen

Ontdek het multi-target geneesmiddel bij maag- en darmklachten!

Iberogast®

Doeltreffend geneesmiddel bij maag- en darmklachten

Monsters en receptstempel op aanvraag via: **info@iberogast.nl**
Voor productinformatie zie elders in deze uitgave.

Iberogast® RVG 103997
Z-index: 50 ml 15633535
Z-index: 100 ml 15633543

Curmaxell

bioactieve curcumine en ar-turmeron

Een stap vooruit waarbij de traditionele kennis van toen wordt gekoppeld aan de innovatieve ontwikkelingen van nu. Door toevoeging van de vluchtige olie uit curcuma - Ar-turmeron - wordt de opneembaarheid sterk verbeterd. De bioactieve curcumine met Ar-turmeron wordt tot **6 x beter** opgenomen wordt en blijft langer actief dan gangbare curcumine.

Curmaxell 60 en 180 caps. met (per softgel):
250 mg bioactieve curcumine en 250 mg lijnzaadolie

Springfield Nutraceuticals, T 0186 626173 E info@springfieldnutra.com

Fenolengehalte en farmaceutische activiteit van culinaire kruiden en specerijen*

M.R. de Jong

*Dit artikel is een samenvatting van: Ramkissoon JS, Mahomoodally MF, Ahmed N, Subratty AH. Relationship between total phenolic content, antioxidant potential, and antiglycation abilities of common culinary herbs and spices. J Med Food 2012;15(12):1-8.

***Advanced glycation endproducts* (AGE's) en oxidatieve stress dragen bij aan de pathogenese van complicaties bij mensen met diabetes. Het totale fenolengehalte, de antioxidantactiviteit en de antiglycosylatie-eigenschappen van de ethanolextracten van 10 culinaire kruiden en specerijen uit Mauritius werden onderzocht in enkele *in vitro*-testen. Fluorescentie (370 nm/440 nm) werd gebruikt als een index voor de glycosylatie van albumine. *Allium sativum* had het hoogste fenolengehalte (3,1 mg galluszuureenheden (GAE)/ml), terwijl *A. cepa* L. de hoogste vrije radicalenvangende capaciteit vertoonde (72%) en *Zingiber officinale* het sterkste ijzer(ferri)reducerende antioxidant-potentieel (FRAP) had (3,0 mg ascorbinezuur-eenheden (AAE)/ml). Daarentegen hadden *Thymus vulgaris* en *Petroselinum crispum* de sterkste antiglycosylatie-activiteit met IC_{50}-waarden van respectievelijk 21,8 mg/ml en 200 mg/ml. Er was geen significant verband tussen het fenolengehalte (r = 0,001), FRAP (r = 0,161) en de antiglycosylatie-activiteit (r = 0,034) voor de onderzochte extracten. Derhalve bleek uit de resultaten dat antiglycosylatie-eigenschappen van plantaardige extracten niet altijd kunnen worden toegeschreven aan het fenolengehalte of de antioxidantactiviteit.**

Introductie

Advanced glycation endproducts (AGE's) worden gevormd door glycosylatie van eiwitten. Hierbij worden suikergroepen onomkeerbaar gebonden aan eiwitten. AGE's ontstaan onder andere onder invloed van hoge bloedglucosespiegels. Antioxidanten beschermen tegen vrije radicalen die bij de glycosylatie vrijkomen en bieden daarom een mogelijkheid als therapeutisch middel. Stoffen met antioxidatieve en antiglycosylatie-eigenschappen hebben een groter effect laten zien bij de behandeling van diabetes mellitus type II dan stoffen met maar een van beide eigenschappen. Daarom is het van belang om te blijven zoeken naar bestaande en nieuwe stoffen die beide eigenschappen bezitten, omdat dezezouden kunnen bijdragen aan de preventie en mogelijk zelfs aan de behandeling van diabetes. Voedingsmiddelen zouden benut kunnen worden voor het onder controle houden van AGE-gemedieerde diabetische pathologische veranderingen *in vivo* en als mogelijke natuurlijke beschermers tegen de vorming van AGE's.

Deze studie onderzocht met *in vitro*-testsystemen de mogelijkheden van lokale culinaire kruiden en specerijen om de glucose-gemedieerde glycosylatie te remmen. Dit onderzoek beoogt het potentieel van voedingsstoffen met antiglycosylatie-eigenschappen te beschrijven en zo een perspectief te bieden voor verder onderzoek naar de *in vivo*-preventie van AGE's. Elke antiglycosylatie-activiteit van planten gebruikt in voeding zou een mogelijke rol kunnen suggereren bij het vertragen van de veroudering en diabetische complicaties. In deze studie werd ook de antioxidantactiviteit van de extracten onderzocht. Hierbij werd ook het totale fenolengehalte bepaald om een verband te kunnen leggen tussen waargenomen antiglycosylatie-eigenschappen en antioxidantactiviteit. Voorzover de auteurs bekend is dit de eerste studie die heeft geprobeerd een verband te leggen tussen het totale fenolengehalte, de antioxidantactiviteit en de antiglycosylatie-eigenschappen van veelgebruikte culinaire kruiden en specerijen.

Materiaal en methoden

Voor dit onderzoek werden de kruiden en specerijen gekocht op een lokale markt. Het betrof kruiden en specerijen die voor het publiek makkelijk verkrijgbaar zijn en die in de dagelijkse voeding op Mauritius veelvuldig gebruikt worden, namelijk knoflook (*Allium sativum*), gember (*Zingiber officinale*), tijm (*Thymus vulgaris*), peterselie (*Petrose-*

linum crispum), kerrie(boom)bladeren (*Murraya koenigii*), pepermunt (*Mentha piperita*), kurkuma (*Curcuma longa*), (lente-)ui (*A. cepa*), koriander (*Coriandrum sativum*) en een lokaal commercieel specerijenmengsel dat traditioneel gebruikt wordt op Mauritius en bestaat uit kruidnagel (*Syzygium aromaticum*), slijmappelbladeren (*Aegle marmelos*), *Banyan*-bladeren (*Ficus bengalensis*) en bitterkomkommer (*Momordica charantia*). De verse kruiden werden tot een pasta gemalen, waarvan vijf gram werd genomen. Dit werd geëxtraheerd in 50% ethanol met een massa: volumeratio van 1:10 (g/ml) bij kamertemperatuur (28°C ± 2°C) gedurende één week. De extracten werden vervolgens gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 1000 g om onopgelost plantenmateriaal te verwijderen.

Resultaten en discussie

In deze studie is te zien dat knoflook de glycosylatie significant remt. Dit is in overeenstemming met de literatuur, waarin ook *in vitro*-antiglycosylatie-eigenschappen zijn aangetoond. Ui was echter een van de minder sterke remmers van de glycosylatie. De sterkste remmers waren tijm, peterselie, pepermunt, kerrie(boom)bladeren en koriander. De gevonden resultaten suggereren dat culinaire kruiden en specerijen inderdaad mogelijke toekomstige antiglycosylatiemiddelen zijn wat de deur opent naar verder onderzoek van de actieve bestanddelen van deze planten.
Met betrekking tot de antioxidantactiviteit werd gevonden dat de referentiestoffen aminoguanidine en ureum radicaalvangende activiteit bezitten, waarbij aminoguanidine sterker werkzaam was. In deze studie werd gevonden dat peterselie, gember, (lente-)ui, kerrie(boom)bladeren en pepermunt een relatief hogere radicaalvangende activiteit bezaten.
De FRAP-analyse liet zien dat alle extracten enige antioxidantactiviteit hadden. Eerdere studies naar het verband tussen totaal fenolengehalte en antioxidantactiviteit lieten in sommige gevallen een lineair verband zien maar in sommige gevallen werd ook geen verband gevonden. De resultaten van deze studie lieten geen significant verband zien tussen totaal fenolengehalte, antioxidantactiviteit en antiglycosylatie-potentieel.

Momenteel is er een groeiende interesse voor fenolische bestanddelen en hun waarde bij de preventie of behandeling van chronische inflammatoire ziekten. Antiglycosylatie en antioxidatieve middelen zouden het proces van AGE-vorming kunnen vertragen door het voorkomen van verder oxidatie. Feitelijk zouden remmers van AGE's met antioxidant activiteit kunnen werken als preventief middel bij diabetische complicaties. Deze studie heeft laten zien dat de antioxidantactiviteit en het totale fenolengehalte van de extracten geen significante bijdrage leverden aan de remming van de fluorescente AGE's. Vele studies suggereren echter dat het vermogen om de vorming van AGE's te remmen nauw samenhangt met de eigenschappen van plantenextracten om vrije radicalen weg te vangen die worden gevormd tijdens de Maillard-reactie. Deze reactie vormt de basis voor glycosylatiereacties. Van belang is dat in dit onderzoek werd gevonden dat sommige extracten die antioxidantactiviteit vertoonden ook een antiglycosylatiepotentieel bezitten. Er zou gesuggereerd kunnen worden dat de antioxidantactiviteit van de kruiden tot op zekere hoogte de antiglycosylatie-eigenschappen rechtvaardigen, alhoewel een direct verband niet is gevonden. Er kan echter ook worden gesteld dat de antiglycosylatiecapaciteit los staat van de antioxidantactiviteit daar er geen rechtstreeks verband is gevonden. Dit kan worden verklaard door het feit dat AGE's worden gevormd middels verschillende mechanismen. Het onderliggende remmende mechanisme van AGE-remmers in deze extracten zou dus op verschillende manieren kunnen werken, bijvoorbeeld door het blokkeren van het binden van de suikers aan eiwitten, door effect uit te oefenen in de vroege stadia van glycosylatie door het remmen van de vorming van Schiff-basen, het blokkeren van de vorming van Amadoritussenproducten, enzovoort. Ook zouden antioxidanten betrokken kunnen zijn bij de remming van de vorming van niet-fluorescerende AGE's.
De resultaten zoals gevonden in deze studie wijzen op het potentieel van sommige componenten uit onze voeding om glycosylatie van eiwitten te voorkomen en/of te remmen. Zulke onderdelen uit ons dieet zouden de *in vivo*-vorming van AGE's kunnen verminderen en zouden hiermee ook het risico op het ontwikkelen van diabetische complicaties kunnen remmen. Er werd in deze studie geen direct verband gevonden tussen de antioxidantactiviteit en het antiglycosylatiepotentieel, wat suggereert dat beide via een ander mechanisme werken. Zeer zeker zijn er meer onderzoeken nodig naar deze voedingscomponenten en hun werkingsmechanismen om een beter beeld te krijgen van hun antiglycosylatie-effect.

Auteursgegevens:

Drs. M.R. (Maaike) de Jong is naast natuurgeneeskundig arts met een BSc in fytotherapie ook docent medische basisvakken en docent fytotherapie en mederedacteur van dit tijdschrift.

Medeling voor NVF-leden

Openbare bestuursvergadering

Op 24 juni behandelt het NVF-bestuur het concept jaarverslag 2012. Daarmee is dit een openbare bestuursvergadering/ALV waarvoor NVF-leden van harte zijn uitgenodigd. Wilt u hierbij aanwezig zijn of dit concept tevoren inzien? Stuur dan een berichtje aan nvf@fyto.nl, zodat wij u de vergaderstukken kunnen toezenden. Locatie: Bunnik. Tijd: 17.00 uur.

Effecten van *Thymus serpyllum*-extract op menselijke borstkankercellen

N. Tode-Gottenbos

*Dit artikel is een vertaling van: Bozkurt E, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Effects of *Thymus serpyllum* on cell proliferation, apoptosis and epigenetic events in human breast cancer cells.Nutr Cancer 2012;64(8):124550.

Wilde tijm (*Thymus serpyllum*) is een aromatische plant met een veelzijdige medicinale werking, onder meer anticarcinogeen. Borstkanker is een veel voorkomende aandoening en het bewijs groeit dat de oorzaak niet alleen genetisch, maar ook epigenetisch kan zijn. DNA-methylering en histon-acetylering zijn de meest bestudeerde epigenetische veranderingen in kankercellen. Deze studie evalueert de effecten van *T. serpyllum* op apoptose en epigenetische veranderingen in borstkankercellen. Er is gebruik gemaakt van de XTT-viabiliteitstest om de cytotoxiciteit van tijmextracten vast te stellen. DNA-fragmentatie en caspase 3/7-activiteit zijn gebruikt om de apoptose te beoordelen. De activiteit van DNA-methyltransferase (DNA-MT) en histon-deacetylase (HDAc) werden beoordeeld door middel van een *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) en gecontroleerd door *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Het methanolextract van *T. serpyllum* was cytotoxisch en veroorzaakte significant apoptose in borstkankercellen (MCF-7 en MDA-MB-231) maar niet in normale cellen. Het methanolextract verhinderde de DNA-MT- en HDAc-activiteit in MDA-MB-231-cellen. In deze studie worden voor het eerst de effecten beschreven van een methanolextract van *T. serpyllum* op normale en borstkankercellen en de resultaten laten zien dat *T. serpyllum* mogelijk een veelbelovende kandidaat is in de ontwikkeling van nieuwe medicatie voor de behandeling van borstkanker.

Introductie

Borstkanker is één van de meest voorkomende aandoeningen en de op één na grootste oorzaak van kankergerelateerde sterfgevallen bij vrouwen [1]. Het ontstaan van borstkanker is complex, waarbij de interactie van meerdere celprocessen nodig is zoals celcyclus, herstel van cellen, apoptose, hormonale respons, invasie van tumorcellen en metastase. Er ontstaat steeds meer bewijs voor het idee dat borstkanker niet alleen een genetische maar ook een epigenetische ziekte is. Belangrijke studies hebben inmiddels laten zien dat epigenetische mechanismen een regulerende rol spelen bij geactiveerde oncogenen (genen die kanker kunnen veroorzaken), geïnactiveerde tumoronderdrukkende genen, hormoonreceptoren, cytokinenreceptoren en groeifactorreceptoren die onderdeel zijn van signaleringstrajecten [2]. De epigenetica onderzoekt veranderingen in genexpressie veroorzaakt door andere mechanismen dan veranderingen in de DNA-sequentie. DNA-methylering en histon-acetylering zijn twee van de meest bestudeerde epigenetische veranderingen in kankercellen. DNA-MT's katalyseren DNA-methylering op de C5-positie van cytosine in CpG- dinucleotiden. Kankercellen hebben afwijkende DNA-methyleringspatronen, waaronder de DNA-hypermethylering van bepaalde genpromotersequenties en globale demethylering van het genoom [3].

Histon-acetyltransferasen (HATs) en HDAc's zijn de enzymen die de acetylering en deacetylering van histonen (bouwstenen voor de DNA-dragende nucleosomen) en andere eiwitten katalyseren. Het dynamische proces van histon-acetylering en -deacetylering is in verband gebracht met gentranscriptie en chromatinehermodellering. Kankercellen worden gekarakteriseerd door een hoog niveau van HDAc-expressie en HDAc's worden daarom ook gezien als een doel voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van kanker [4].

Tijm

Tijm is een aromatische plant in de familie van de lipbloemen (*Labiatae*) en komt veelvuldig voor in gematigde klimaatzones, met ongeveer 350 ondersoorten over de gehele wereld [5]. *Thymus*-soorten zijn bekend als medicinale planten vanwege hun biologische en farmacologische eigenschappen [6]. Verschillende extracten van wilde tijm (*T. serpyllum*) worden ingezet voor verscheidene doeleinden, bijvoorbeeld als antisepticum, anthelminticum, carminativum, expectorans, sedativum en tonicum [7]. Ze worden beschouwd als bron van vluchtige olie met verschillende biologische eigenschappen, waaronder een anticarcinogene activiteit [8].

Het belangrijkste doel van deze studie was het onderzoeken van mogelijke cytotoxische effecten en het effect op apoptose van een methanolextract van *T. serpyllum* in MCF-7 en MDA-MB-231 borstkankercellen, alsmede het effect in gezonde MCF-10A-borstcellen. Het tweede doel was het beoordelen van de epigenetische veranderingen, waaronder de activiteit van DNA-MT en HDAc in met het extract behandelde en onbehandelde borstkankercellen.

Materiaal en methode

Cellijnen en reagentia

De gebruikte cellijnen zijn die van normale menselijke borstcellen (MCF-10A) en borstkankercellen (MCF-7 en

MDA-MB-231). De cellen werden als enkellaags groeiende cellijnen routinematig gekweekt in RPMI 1640, aangevuld met 10% hitte-geïnactiveerd foetaal kalfsserum, 1% L-glutamine en 1% penicilline-streptomycine, en gehouden in een vochtige omgeving van 37°C met 5% CO_2. Groei en morfologie werden regelmatig gecontroleerd en cellen werden doorgezet bij het bereiken van 90% celdichtheid.

Plantenmateriaal en extractie
Het plantmateriaal van *T. serpyllum* werd aangekocht als gedroogd poeder. Gedroogd poeder (6,58 gram) van *T. serpyllum* werd geëxtraheerd in methanol. Het methanolextract werd geconcentreerd onder verlaagde druk tot een visceus materiaal was verkregen. Daarna werd het visceuze plantenextract opgelost in 15ml methanol tot een uiteindelijke concentratie van 439 mg/m, en opgeslagen bij 4°C. De uiteindelijke verdunningen werden direct voor gebruik gemaakt en voor ieder experiment werden nieuwe verdunningen van de moedertinctuur gemaakt.

XTT-viabiliteitstest
De levensvatbaarheid van de cellen werd geverifieerd door middel van een trypaanblauw exclusietest. Daarna werden de cellen uitgezaaid in een concentratie van ongeveer $1x10^4$ cellen/200 µl in 96-welletjesplatbodem microtiterplaten met en zonder verschillende concentraties van het methanolextract. De platen werden geïncubeerd bij een temperatuur van 37°C in een 5% CO_2-stoof gedurende 24, 48 en 72 uur. De media werden gedurende deze periode niet ververst. Aan het einde van de incubatie werd 100 µl XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) toegevoegd aan iedere wel, waarna de platen nogmaals vier uur werden geïncubeerd bij 37°C. De omzetting van XTT tot een gekleurd reactieproduct als maat voor de mitochondriale activiteit – en daaraan gerelateerde levensvatbaarheid – van de cellen werd gemeten bij 450 nm tegen een referentiegolflengte van 650 nm met behulp van een spectrofotometer voor microtiterplaten. Het gemiddelde van drie experimenten voor iedere dosering werd gebruikt voor het berekenen van de IC_{50}-waarden.

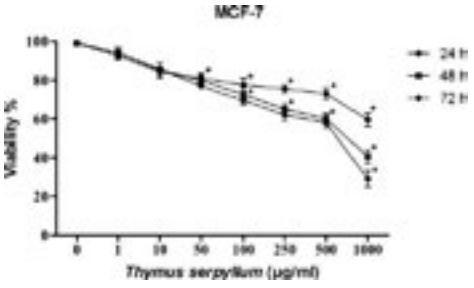
Evaluatie van apoptose door middel van de DNA-fragmentatietest
De apoptose werd geëvalueerd door middel van ELISA-testen. Hierbij werden de relatieve hoeveelheden mono- en oligonucleosomen uit de apoptotische cellen gekwantificeerd middels het gebruik van monoclonale antilichamen gericht tegen DNA en histonen.

Caspase 3/7 enzymactiviteitstest
Apoptose werd tevens bevestigd door het gebruik van de caspase-Glo 3/7 test. MDA-MB-231-cellen werden in een concentratie van $1x10^4$-cellen/100 µl cultuurmedium uitgezaaid in een microtiterplaat en, met en zonder toevoeging van oplopende hoeveelheden van het extract, gedurende 72 uur geïncubeerd. Daarna werd 100 µl van het caspasereagens toegevoegd aan iedere wel en werden de microtiterplaten nogmaals gedurende één uur bij kamertemperatuur geïncubeerd. De luminescentie van ieder monster werd gemeten met een luminometer.

DNA-methyltransferase activiteitstest
De totale DNA-MT-activiteit werd gemeten met een DNA-MT-activiteit/inhibitie test. Kernextracten werden geïsoleerd, waarna 20 µl-kernextract werd toegevoegd aan iedere reactiewel. De kernextracten werden geïncubeerd met een methylatiesubstraat gedurende één uur bij 37°C, daarna bij kamertemperatuur gedurende één uur en 30 minuten blootgesteld aan twee antilichamen waarmee de methylering van DNA werd gekwantificeerd. Absorptie werd gemeten bij 450 nm met een spectrofotometer voor microtiterplaten. DNA-MT-activiteit (ng/uur/ml) werd berekend volgens de instructies van de fabrikant van de test. Deze analyse geeft de niveaus van de totale DNA-MT-activiteit en is niet specifiek voor een bepaald gen of een bepaalde DNA-MT.

Histondeacetylase activiteitstest
De totale HDAc-activiteit werd gemeten met HDAc activiteit/inhibitietest. Kernextracten (20 µl) werden geïncubeerd met specifiek substraat gedurende één uur bij 37°C en daarna bij kamertemperatuur gedurende één uur en 30 minuten blootgesteld aan twee antilichamen waarmee de deacetylering van histonen werd gekwantificeerd.

Real-time *kwantitatieve PCR-test*
Om de resultaten van de enzymactiviteitstesten te valideren, werd een qRT-PCR uitgevoerd op DNA-MT1- en HDAc1-genen. DNA-MT1 wordt beschouwd als een onderhouds-DNA-MT [9]. Bovendien zijn veranderde niveaus van DNA-MT1-expressie veelvuldig in verband gebracht met verschillende typen tumoren, waaronder borstkanker. Het is aangetoond dat DNA-MT1- en HDAc1-expressie is verhoogd in borstkankercellen [9,10] en dat hogere niveaus van HDAc1 zijn gecorreleerd met meer agressieve tumoren [10]. Om deze reden zijn DNA-MT1 en HDAc1 in deze studie gekozen voor verder onderzoek. Glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase (GAPDH) werd gebruikt als positieve controle.
RNA (4 µg) werd geëxtraheerd uit celmonsters en gekwantificeerd met een spectrofotometer. De integriteit en kwaliteit van het geïsoleerde RNA werd bepaald met behulp van agarose gel-elektroforese. Een PCR-reagensmengsel met onder andere cDNA-monsteroplossing, gen-specifieke PCR-*primers* en cDNA-oplossing voor iedere *primer* in een uiteindelijk volume van 25 µl. Na de PCR-reactie werden de gegevens genormaliseerd voor GADPH als endogene controle. Elke gevonden cyclusdrempel (CD) werd genormaliseerd naar de gemiddelde CD van de endogene controle op basis van steekproeven. De vergelijkende CD-methode werd gebruikt om de relatieve kwantificering van genexpressie uit te rekenen.



Figuur 1: Dosis- en tijdsafhankelijke inhibitie van de levensvatbaarheid van MCF-7- borstkankercellen door een methanolextract van T. serpyllum*. Cytotoxiteit werd vastgesteld door middel van een XTT-viabiliteitstest. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde van drie verschillende experimenten (± SD) (*p< 0,05 in vergelijking met de onbehandelde controlegroep).*

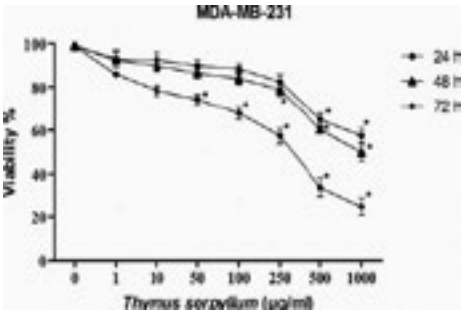
Tijm

Resultaten

Cytotoxische effecten

Gebruikmakend van gezonde borstcellen (MCF-10A) en borstkankercellen (MCF-7 en MDA-MB-231) zijn eerst de tijds- en doseringsafhankelijke effecten van *T. serpyllum*-extract gemeten op de levensvatbaarheid van de cellen. Hiervoor werden borstkankercellen en normale borstcellen blootgesteld aan oplopende concentraties van het extract (1 tot 1000 µg/ml) gedurende 24, 48 en 72 uur, waarna een XTT-viabiliteitstest werd uitgevoerd.

Het methanolextract van *T. serpyllum* bleek niet cytotoxisch voor normale borstcellen, zelfs niet in de hoogste concentraties (data niet weergegeven). Wel verminderde het methanolextract tijds- en doseringsafhankelijk de levensvatbaarheid van beide borstkankercellijnen ($p < 0,05$).

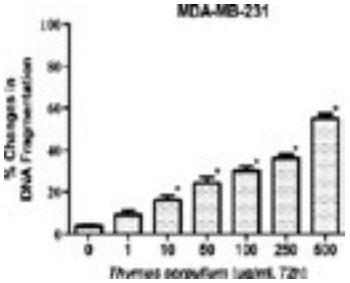


Figuur 2: Dosis- en tijdsafhankelijke inhibitie van de levensvatbaarheid van MDA-MB-231- borstkankercellen door het methanolextract van T. serpyllum. *Cytotoxiciteit werd vastgesteld door middel van een XTT-viabiliteitstest. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde van drie verschillende experimenten (± SD) (*p< 0,05 in vergelijking met de onbehandelde controlegroep).*

Zoals weergegeven in figuur 1 was er, vergeleken met onbehandelde controlecellen na 72 uur, een afname in levensvatbaarheid van MCF-7 cellen van 15%, 32%, 42,5% en 71% wanneer deze werden blootgesteld aan respectievelijk 10, 100, 500 en 1000 µg/ml methanolextract ($p < 0,05$). De MDA-MB-231-cellen lieten een afname in levensvatbaarheid zien van 22%, 33%, 66% en 75% na blootstelling aan respectievelijk 10, 100, 500 en 1000 µg/ml extract ($p<0,05$) (figuur 2). De hoogste mate van cytotoxiciteit werd waargenomen na 72 uur met IC_{50}-waarden van het *T. serpyllum*-extract in MCF-7- en MDA-MB0231-cellen van respectievelijk 509 µg/ml en 276 µg/ml. De lagere IC_{50}-waarde in MDA-MB-231-cellen in vergelijking met de MCF-7-cellen is een indicatie voor de grotere gevoeligheid

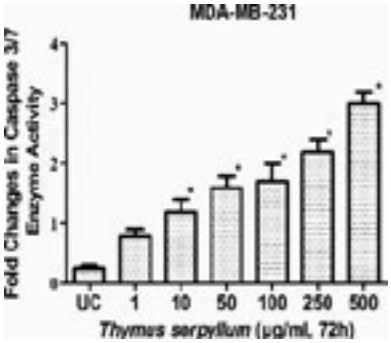
van deze cellen voor het cytotoxisch effect van het methanolextract. Verdere onderzoeken werden daarom alleen uitgevoerd met MDA-MB-231-cellen.

DNA-fragmentatie wordt door T. serpyllum*-extract op een dosisafhankelijke manier geïnduceerd in MDA-MB-231-borstkankercellen*
Om de inductie van apoptose als reactie op het *T. serpyllum*-extract in MDA-MB-231-borstkankercellen te onderzoeken, werden deze cellen gedurende 72 uur geincubeerd met oplopende concentraties van het extract, waarna mono- en oligonucleosoomfragmenten werden gekwantificeerd. De resultaten lieten zien dat het *T. serpyllum*-extract dosisafhankelijke apoptose induceerde in MDA-MB-231-cellen. Zoals te zien is in figuur 3 waren er stijgingen in de DNA-fragmentatie van 16%, 30%, 36% en 55% bij blootstelling aan respectievelijk 10, 100, 250 en 500 µg/ml van het methanolextract, vergeleken met onbehandelde controlegroepen ($p < 0.05$).



Figuur 3: Apoptotische effecten van T. serpyllum*-extract in MDA-MB-231-cellen door middel van DNA-fragmentatieanalyse na 72 uur. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde van drie verschillende experimenten (± SD) (*p< 0,05 in vergelijking met de onbehandelde controlegroep).*

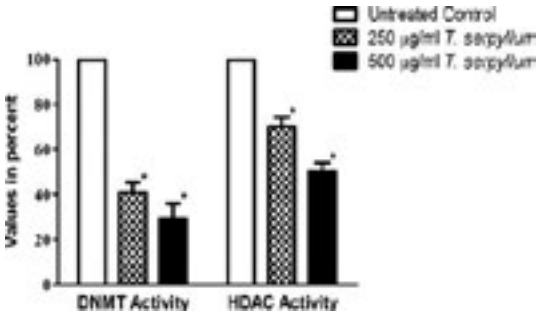
In reactie op T. serpyllum*-extract wordt een toename in caspase-3/7 enzymactiviteit gevonden in MDA-MB-231-borstkankercellen*
Om de mogelijke effecten van het methanolextract op de inductie van apoptose bij MDA-MB-231-borstkankercellen beter te kunnen beoordelen, werd het effect op caspase 3/7 enzym-activiteit gemeten na blootstelling gedurende 72 uur aan toenemende concentraties methanolextract. Vergelijkbaar met de resultaten van de DNA-fragmentatietest werd een 1,6-, 2,2-, en 3,0-voudige toename in caspase 3/7 enzymactiviteit waargenomen in MDA-MB-231-



Figuur 4: Apoptotische effecten van T. serpyllum*-extract in MDA-MB-231-cellen door middel van analysevan de caspase 3/7 enzymactiviteit na 72 uur. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde van drie verschillende experimenten (± SD) (*p< 0,05 in vergelijking met de onbehandelde controlegroep).*

cellen die werden geïncubeerd met respectievelijk 10, 250 en 500 µg/ml van het methanolextract,vergeleken met onbehandelde controlegroepen ($p < 0.05$) (figuur 4).

T. serpyllum*extract blokkeert zowel de DNA-MT- als de HDAc-enzymactiviteit in MDA-MB-231-cellen.*
Om het effect van *T. serpyllum*-extract op DNA-MT- en HDAc-enzymactiviteit te evalueren werden DNA-MT- en HDAc-activiteits/inhibitietesten uitgevoerd. Blootstelling aan stijgende concentraties van het extract gedurende 72 uur resulteerde in een dosisafhankelijke blokkering van de DNA-MT- en HDAc-enzymactiviteit in MDA-MB-231-cellen, vergeleken met onbehandelde controlegroepen ($p < 0,05$) (Figuur 5). Ook zijn er veranderingen op het mRNA-niveau van de DNA-MT1- en HDAc1-enzymen waargenomen met qRT-PCR. Er werden 2,4- en 1,8-voudige dalingen in de mRNA-niveaus van DNA-MT1- en HDAc1-enzymen gevonden in MDA-MB-231-cellen die blootgesteld waren aan een IC_{50} concentratie van het *T. serpyllum*-extract (276 µg/ml) gedurende 72 uur ($p < 0,05$) (data niet weergegeven).



Figuur 5: Effecten van T. serpyllum*-extract op de globale epigenetische patronen van DNA-methylatie en histondeacetylatie in MDA-MB-231 cellen. DNA-methyltransferase en histon-deacetylaseenzymactiviteit werden beoordeeld in de cellen die gedurende 72 uur behandeld waren met het T. serpyllum-extract. De resultaten zijn weergegeven als gemiddelde van drie verschillende experimenten (± SD) (*p< 0,05 in vergelijking met de onbehandelde controlegroep).*

Discussie

Hoewel de overlevingskans bij borstkanker door vroege detectie en verbeterde behandelingsmogelijkheden is gestegen, is borstkanker nog altijd één van de meest dodelijke kankersoorten onder vrouwen [1]. Het gebruik van fytochemische bestanddelen in het dieet en uit planten krijgen wijdverbreide aandacht voor de preventie en behandeling van verschillende kankersoorten [11]. De potentiële cytotoxiciteit van extracten van planten uit de lipbloemigenfamilie werd recent beschreven in verschillende studies [5, 12-15]. Badisa *et al*. onderzochten 19 methanolextracten uit de lipbloemigenfamilie op cytotoxische activiteit tegen MCF-7, Caco-2 en HepG2 menselijke kankercellijnen. Van de vijf geteste *Thymus*-soorten werd gevonden dat alleen *Thymus parnassicus* Halacsy actief was tegen MCF-7-cellen (LC_{50} = 54,7 µg/ml), HepG2-cellen (LC_{50} = 50,3 µg/ml) en Caco-2-cellen (LC_{50} = 44,6 µg/ml). Een extract van *T. serpyllum* werd echter niet onderzocht. In deze studie werd het methanolextract van *T. serpyllum* getest en cytotoxisch bevonden tegen zowel MCF-7- en MDA-MB-231-borstkankercellen. Bovendien lieten Badisa *et al*. zien dat het extract van *Thymus parnassicus* Halacsy relatief inactief was op gezonde borstcellen. In het huidige onderzoek werden vergelijkbare data verkregen, wat aangeeft dat het *T. serpyllum*-extract niet cytotoxisch was voor

normale borstcellen, MCF-10A. Het tumor-specifieke effect van het methanolextract zou gebruikt kunnen worden voor verdere studies tegen kankercellen met pure componenten [12].
Hoewel apoptose één van de belangrijkste mechanismen is voor door chemotherapiegeïnduceerde celdood bij kanker, is het cytotoxische effect van chemotherapeutica op normale cellen ongewenst en een punt van grote zorg. Het is derhalve nodig om te zoeken naar nieuwe chemopreventieve en antitumormiddelen om behandelingsstrategieën te kunnen vinden die zich specifiek richten op het verhogen van de apoptotische celdood in carcinogene cellen, met minimale effecten op gezonde cellen. Zoals duidelijk wordt uit onze resultaten, blokkeert het extract van *T. serpyllum* de levensvatbaarheid van borstkankercellen en induceert het de apoptose in deze cellen. Deze effecten (cytotoxiciteit en apoptose) werden echter niet waargenomen in gezonde menselijke borstcellen. Ook interessant was de observatie dat MDA-MB-231-kankercellen veel gevoeliger waren voor de cytotoxische effecten van *T. serpyllum* in vergelijking tot MCF-7-cellen. Dit verschil kan mogelijk verklaard worden door het verschil in genotype tussen deze twee cellijnen. MDA-MB-231-cellen hebben geen oestrogeenreceptoren en zijn gevoeliger voor de effecten van de cytotoxische behandeling, terwijl MCF-7-cellen wel deze oestrogeenreceptor hebben.

De afgelopen jaren heeft het bewijs zich opgestapeld dat epigenetische veranderingen bijdragen aan diverse biologische en ziekteprocessen zoals kanker. De meest voorkomende vormen van epigenetische veranderingen omvatten DNA-methylering en histonmodificaties. Een grote hoeveelheid data laat zien dat de activiteit van DNA-MT's verhoogd is in neoplastische cellen en dat deze verhoogde activiteit in verband gebracht kan worden met verhoogde celproliferatie, tumorgenese en tumorprogressie [16]. Ook is gerapporteerd dat HDAc in verhoogde mate aanwezig is in veel typen menselijke kankercellijnen en in verschillende tumoren [17-20]. Aangezien epigenetische veranderingen omkeerbaar zijn, kan het beïnvloeden van deze gebeurtenissen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van borstkanker. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van nieuwe demethyleringsmiddelen of remmers van histondeacetylatie die afwijkende DNA-hypermethylatiepatronen in borstkankercellen kunnen helpen rechtzetten en die een normale groei kunnen stimuleren in deze cellen [21]. In deze studie werd de DNA-MT- en HDAc-enzymactiviteit gemeten na blootstelling aan verschillende concentraties van het extract om te onderzoeken of het enig effect had op epigenetische gebeurtenissen in borstkankercellen. De mRNA-expressie van DNA-MT1 en HDAc1 in borstkankercellen werden eveneens bepaald. De resultaten laten zien dat *T. serpyllum* een significante daling in zowel DNA-MT- als HDAc-enzymactiviteit veroorzaakte, wat in verband gebracht werd met verlaagde mRNA-expressie van DNA-MT1 en HDAc1. Dit zou een mogelijk epigenetisch mechanisme van *T. serpyllum* kunnen zijn.

In de huidige studie zijn voor het eerst effecten gerapporteerd van *T. serpyllum*-extract op de levensvatbaarheid van MCF-10A-, MCF-7- en MDA-MB-231-cellen. Bovendien werd aangetoond dat een methanolextract van *T. serpyllum* apoptose veroorzaakte in borstkankercellen en dat het DNA-MT- en HDAc-activiteit verminderde. Dit impliceert uiteindelijk dat *T. serpyllum* een veelbelovende kandidaat is in de ontwikkeling van nieuwe therapeutica voor de behandeling van borstkanker.

Auteursgegevens:

N. (Nienke) Tode-Gottenbos is herborist met een eigen praktijk en hbo-studente Voeding en Gezondheid aan de CAH Dronten.

Literatuur

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61(2):69-90.

2 Mulero NS, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. Crit Rev Oncol Hemat 2008;68(1):1-11.

3 Xiao DY, Sheng ZG. Epigenetic drugs for cancer treatment and prevention: mechanisms of action. Biomol Concepts 2010;1:239-51.

4 Ganesan A,Nolan L, Crabb SJ, PackhamG. Epigenetic therapy: histone acetylation, DNAmethylation and anti-cancer drug discovery. Curr CancerDrug Targets 2009;9:963-81.

5 Ur-Rehman A, Mannan A, Inayatullah S, Akhtar MZ, Qayyum M, Mirza B. Biological evaluation of wild thyme (*Thymus serpyllum*). Pharmac Biol 2009;47(7):628-33.

6 Javad SG, Mohammad HM, Shabnam S, Meysam H, Abbas H: Chemichal characterization of bioactive volatile molecules of four *Thymus* species using nanoscale injection method. Dig J Nanomater Bios 2009;4:835-41.

7 Elisabeth SB, Francisco S.Thyme. Taylor & Francis, London 2002.

8 Raal A, Paaver U, Arak E, Orav A. Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. Medicina(Kaunas) 2004;40(8):795-800.

9 Veeck J, Esteller M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010;15(1):5-17.

10 Xu X, Jin H, Liu Y, Liu L,Wu Q, Guo Y, Yu L, Liu Z, Zhang T, Zhang X, Dong X, Quan C. The expression patterns and correlations of claudin-6, methy-CpG binding protein 2, DNA methyltransferase 1, histone deacetylase 1, acetyl-histone H3 and acetyl-histone H4 and their clinicopathological significance in breast invasive ductal carcinomas. DiagnPathol 2012;7:33.

11 Sporn MB, Suh N: Chemoprevention of cancer. Carcinogenesis 2000;21:525-30.

12 Badisa RB, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E. Cytotoxic activities of some greek labiatae herbs. Phytother Res 2003;17:472-6.

13 Kaileh M, Vanden Berghe W, Boone E, Essawi T, Haegeman G. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. J Ethnopharmacol 2007;113:510-6.

14 Mustafa T, Atalay S, Kursat K, Zubeyde AP, Metin S. Antineoplastic properties of some plant extracts which are endemic in sivas. CMJ 2010;32:9-18.

15 Chaouki W, Leger DY, Eljastimi J, Beneytout JL, Hmamouchi M. Antiproliferative effect of extracts from Aristolochia baetica and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF 7. Pharmac Biol 2010;48:269-74.

16 Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. Endocr Relat Cancer 2001;8(2):115-27.

17 Gao L, Cueto MA,Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAc11, a novel member of the human histone deacetylase family. J Biol Chem 2002;277:25748-55.

18 Ozdag H, Teschendorff AE, Ahmed AA, Hyland SJ, Blenkiron C, Bobrow L, Veerakumarasivam A, Burtt G, Subkhankulova T, Arends MJ, Collins VP, Bowtell D, Kouzarides T, Brenton JD, Caldas C. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. BMC Genomics 2006;7:90.

19 Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Mol Oncol 2007;1:19-25.

20 Butler KV, Kozikowski AP. Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors. Curr Pharm Design 2008;14:505-528.

21 Cai FF, Kohler C, Zhang B,WangMH, Chen WJ, Zhong XY. Epigenetic therapy for breast cancer. Int J Mol Sci 2011;12:4465-87.

Peterselie, garnering voor het zenuwstelsel?

G. van Elteren

Peterselie is vooral bekend als keukenkruid en bij fytotherapeuten ook als kruid dat diuretische en carminatieve eigenschappen heeft in alle plantendelen. Ook is het kruid van oudsher als emmenagoog in gebruik en een bestanddeel van de vluchtige olie – apiol – werd aan het eind van de 19de eeuw tot het begin van de 20ste eeuw toegepast als abortivum onder de naam ergoapiol of apergol [1].

Peterselie (*Petroselinum crispum*), een tweejarige plant uit de schermbloemenfamilie (*Apiaceae*), is medicinaal en culinair in gebruik in de vorm van drie varianten:
1.) Platte peterselie of bladpeterselie –*P. crispum* var. *neapolitanum*;
2.) Krulpeterselie –*P. crispum* var. *crispum*;
3.) Wortelpeterselie –*P. crispum* var. *tuberosum*.
De werkzame stoffen bevinden zich in de gehele plant, maar zijn het sterkst geconcentreerd in de vluchtige olie van de zaden.

Naast apiol is myristicin een belangrijke stof in de vluchtige olie van de zaden van peterselie. Deze stof is vooral bekend als het psychoactieve bestanddeel (800-12.800 ppm) [2] in nootmuskaat (*Myristica fragrans*) als men aanzienlijke hoeveelheden van dit specerij oraal toedient. Opvallend is echter dat myristicin in de zaden van peterselie in nog grotere hoeveelheden te vinden is (14.785 – 19.800 ppm) [2].

De aanwezigheid van myristicin in peterselie is interessant vanwege de werking op het zenuwstelsel en de mogelijkheid van meer toepassingen met peterselie dan enkel de diuretische en carminatieve effecten. Ook zijn er individuele gevallen bekend waar sprake lijkt te zijn van een peterselieverslaving.
Myristicin is een fenylpropeen en is niet oplosbaar in water maar wel in alcoholen en vetten en kent naast de psychoactieve werking ook andere effecten op het zenuwstelsel. Het is bekend dat myristicin, als geïsoleerde stof, werkt als een monoamine-oxidaseremmer in muizen [3]. De werking lijkt niet zo sterk als die van veelgebruikte reguliere antidepressiva, maar voor milde stemmingsstoornissen zou het in theorie een positief effect kunnen hebben.

Hallucinaties

In 1963 opperde Alexander Shulgin in zijn boek *PiHKAL: A Chemical Love Story ook het onbevestigde idee dat myristicin in de lever kon worden gemetaboliseerd in* 3-methoxy-4,5-methyleendioxyamfetamine (MMDA). MMDA is een psychoactieve stof, analoog aan lofofine, 3,4-methyleendioxyamfetamine en 3,4-methyleendioxy-N-methamfetamine. Het veroorzaakt euforie, een liefdevol gevoel en vermindert angstgevoelens en gevoelens van eenzaamheid. In een hoge dosering veroorzaakt deze stof echter ook visuele hallucinaties, spierontspanning en een verandering van tijdservaring [4,5,6].

Myristicin heeft ook andere kenmerken van MMDA. Het werkt als een anticholinergicum en blokkeert dus de neurotransmitter acetylcholine in het centrale en perifere zenuwstelsel. Acetylcholine speelt een rol in de impulsoverdracht van zenuwcellen naar de cellen van de skeletspieren. Blokkering van acetylcholine is een van de pijlers

Platte peterselie

in de symptoombestrijdingbij de ziekte van Parkinson; het zorgt voor vermindering van de rigiditeit van spieren en daarmee vermindert het de voor de ziekte van Parkinson zo kenmerkende bewegingsarmoede. De negatieve effecten van een anticholinergicum kunnen echter aanzienlijk zijn, zoals een secretievermindering (speeksel en urine), constipatie, maar ook delier.

Myristicin wordt gezien als de belangrijkste psychoactieve stof in nootmuskaat en beslaat ongeveer tweederde van de aromatische fractie van nootmuskaat, maar onderzoek naar het gebruik van zowel de hele noot als het geïsoleerde myristicin, toontin deze context aan dat waarschijnlijk meerdere stoffen in de plant een rol spelen. Een dosering van 400 mg zuivere myristicin (ongeveer twee keer de hoeveelheid die een persoon zou innemen om een entheogene ervaring met nootmuskaat te hebben) produceerde slechts milde effecten [6,7]. Onduidelijk is welke andere stoffen in nootmuskaat een synergistische rol spelen in het entheogene effect van deze specerij, maar elemicin vormt een interessante kandidaat [7]. Dit verklaart mogelijk ook waarom het eten van grote hoeveelheden peterselie niet tot een directe bewustzijnsverandering leidt, aangezien naast myristicin andere bestanddelen in peterselie aanwezig zijn dan in nootmuskaat.

Antidepressieve werking

In hoeverre peterselie als kruid een antidepressieve werking heeft, is nooit onderzocht. Er is weinig onderzoek uitgevoerd naar peterselie en het onderzoek dat er is, is uitsluitend *in vitro* of op proefdieren uitgevoerd. Wel is er een onderzoek dat wijst op een mild sederende werking van peterselie [8]. Inmiddels wordt er wel gewaarschuwd voor de interactie die peterselie theoretisch kan hebben met reguliere antidepressiva en opiaten. Deze interactie zou dan kunnen leiden tot het serotoninesyndroom [9]. Casussen zijn er in dit verband echter niet, de interactie is zuiver van theoretische aard. De aanwezigheid van myristicin in peterselie in redelijke hoeveelheden zou een reden kunnen zijn om de werking van peterselie als antidepressivum eens nader te onderzoeken, het liefst natuurlijk in samenhang met de andere aanwezige stoffen in het kruid.

Auteursgegevens:

G. (Gonnie) van Elteren is fytotherapeut en oprichter van Herba Sanitas Kruidenopleidingen te Heeswijk-Dinther.

Literatuur

1 Shorter E. A history of women's bodies. New York, Basic Books. 1982.*Bulletin géneral de thérapeutique médicale*, 1909;158 (A history of apiol and abortions).

2 DukeJA.Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. 1992. Beschikbaar via: www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ [bezocht op 01-03-2013]).

3 Truitt EB, Duritz G, Ebersberger EM. Evidence of monoamine oxidase inhibition by myristicin and nutmeg. Proc Soc Exp Biol Med 1963;112(3):647-50.

4 Panayotopoulos DJ, Chisholm DD. Hallucinogenic effects of nutmeg. BMJ1970;1(5698):754.

5 Brenner N, Frank OS, Knight E. Chronic nutmeg psychosis. J R Soc Med1993;86(3):179-80.

6 Schultes RE, Hofmann A. The botany and chemistry of hallucinogens. Charles C Thomas, Springfield 1980.

7 Weil AT. The use of nutmeg as a psychotropic agent. United Nations Office of Drugs and Crime, 1966/01/01. Beschikbaar via: www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1966-01-01_4_page003.html [bezocht op 15-03-2013].

8 Bursac M, Popovic M, Mitic R, Karuinovic B, Jakovljevic V. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*.) and celery (*Apium graveolens*.) extracts on induction and sleeping time in mice. Pharm Biol 2005;43(9):780-3.

9 Ask Doc Web. Parsley. Beschikbaar via: www.askdocweb.com/parsley.html [bezocht op 01-03-2013].

Boekbespreking

Mooi en fit door de wijndruivenpit; de herontdekking van de weldadige wijndruif. N. Douben. ISBN: 978-90-813993-0-2. eNDee-Wine Research, Nuenen 2012, 52 pagina's.

De titel van dit boek(je) is tekenend voor de inhoud. Inderdaad, het boek gaat over de gezondheidseffecten van de druivenpit. In de ondertitel wordt echter ook verwezen naar de druif zelf als grondstof voor de productie van wijn, en dit geeft heel mooi de meerdere bedoelingen weer die de auteur met het schrijven van dit boek gehad lijkt te hebben. Het gaat over de druif én de druivenpit, het gaat over wijnbouw en vinologie én over gezondheid, het is informatief en toegankelijk geschreven maar probeert ook wetenschappelijke onderbouwing te geven. Kortom, het hinkt allemaal wat op meerdere gedachten. Dit wordt bijvoorbeeld geïllustreerd in het eerste hoofdstuk 'Van 'godendrank' naar vitaliteit'. Moeiteloos wordt hier geschakeld van de bijbelse figuur Noach die wordt gekwalificeerd als de eerste wijnboer na de zondvloed, via de systeembiologie die meer licht kan werpen op de biologische/farmacologische activiteit van complexe plantaardige mengsels, via ook de voordelen van de biologisch-dynamische wijnbouw waar geen sulfiet aan de wijn wordt toegevoegd, tot – uiteindelijk – de gezondheidseffecten van (voedingssupplementen op basis van) de druivenpit.

Wat echter vooral stoort bij het lezen van dit boek zijn de herhalingen in de tekst. De vele beweringen die weinig tot geen wetenschappelijke onderbouwing krijgen, zijn eveneens een doorn in het oog. Nergens in de tekst wordt gebruik gemaakt van referenties maar is er slechts een algemene bibliografie opgenomen met qua wetenschappelijk aanzien over het algemeen discutabele bronnen en wordt er gebruikgemaakt van zeker niet onomstreden termen als 'bioflavonoïden' en 'salvesterolen'. In veel gevallen raakt het beschrevene – bijvoorbeeld het hoofdstuk over radicalen – weliswaar aan de waarheid maar is geen enkele nuance aangebracht. Zo wordt ergens in het boek geconcludeerd dat producten op basis van de druivenpit 'het doeltreffendste middel vormen tegen deze agressieve zuurstofmoleculen'. Een pagina eerder wordt echter in een tabel getoond dat – op basis van de gemiddelde geconsumeerde (dagelijkse) hoeveelheid – de antioxidantcapaciteit van de druivenpit slechts net tot de top-tien reikt en veruit overtroffen wordt door de antioxidatieve werking van verschillende bessen (onder andere vlier- en bosbessen, cranberry's en bramen) maar ook pure chocolade.

Geconcludeerd moet dan ook worden dat dit boekje vooral lijkt te zijn geschreven uit enthousiasme en liefde voor de druif/druivenpit. Deze boodschap wordt tenminste ten volle uitgedragen. Van een schrijver die zich op de achterkaft van het boek afficheert als lector op de HAS Den Bosch mag echter toch een hoger, wetenschappelijk inhoudelijker, niveau worden verwacht.

S.B.A. Halkes

Auteursgegevens:

Dr. S.B.A. (Bart) Halkes is onder andere mede-oprichter en aandeelhouder van PhytoTreat B.V., een bedrijf dat zich richt op de ontwikkeling en verkoop van wetenschappelijk onderbouwde natuurlijke gezondheidsproducten voor mens en dier. Daarnaast is hij (eind)redacteur van dit tijdschrift.

Korte berichten

Universiteit Groningen leidt Nederlands-Duits onderzoeksproject over plantenstoffen

De Rijksuniversiteit Groningen (RUG, leerstoel Farmaceutische Biologie) is penvoerder van het project 'Phytosana', dat op 17 maart 2013 werd gepresenteerd in het Duitse Papenburg. Doel is medicijnen te ontwikkelen op basis van verbindingen uit planten. Andere partners in dit project zijn de Hanzehogeschool, het Duitse instituut voor levensmiddelentechnologie en een groot aantal bedrijven. Financiële ondersteuning is er van onder meer de provincie Groningen en de Eems-Dollard Regio.
De populariteit van kruidengeneeskunde en andere kruidentoepassingen neemt in Nederland maar vooral in Duitsland sterk toe. Kruiden bevatten grondstoffen voor medicijnen. Kruiden met een verhoogd gehalte aan inhoudstoffen in combinatie met (nieuwe) extractietechnieken bieden nieuwe mogelijkheden voor het winnen van deze actieve inhoudstoffen op een kosteneffectieve wijze. Deze actieve inhoudstoffen zijn dan direct als medicijn of als grondstof voor medicijnen geschikt. Door veredeling van de kruiden is het gehalte aan inhoudstoffen te verhogen. Op deze wijze kunnen bepaalde medicijnen effectiever geproduceerd worden dan via de synthetische-chemische routes. Fluitenkruid (*Anthriscus sylvestris*) is een veelvoorkomende plant in de Nederlandse wegbermen. In dit project worden onder meer de mogelijkheden van podofyllotoxine productie uit het (on)kruid fluitenkruid (*Anthriscus sylvestris*) onderzocht. Andere thema's die in dit project worden geadresseerd zijn: registratie van kruidengeneesmiddelen op basis van de EMA monografieën, kruiden voor gezonde voeding en cosmetica, gardens of health and beauty.

Bron: Dagblad van het Noorden, 18 maart 2013 en website RUG: www.rug.nl/research/pharmaceutical-biology/phytosana/phytosana.

European Food Safety Authority herziet *Compendium* of *Botanicals*

In 2009 verscheen de eerste versie van het *Compendium of Botanicals* van de *European Food Safety Authority* (EFSA). Het betreft een overzicht van planten (inclusief de betrokken plantendelen) die enige aandacht behoeven indien zij in voedingsmiddelen verwerkt zijn omdat er toxische, verslavende, psychotrope of andere problematische stoffen in (kunnen) zitten. Of deze stoffen ook daadwerkelijk (veel) in een eindproduct voor consumptie voorkomen is dan vervolgens nog afhankelijk van de bereiding. Deze situatie doet zich bij veel voedingsmiddelen voor. Het groen van aardappels of tomaten bijvoorbeeld is giftig en ook een rauwe aardappel kan beter niet op tafel komen. Dit lijkt misschien wat overdreven, maar we leven in een multiculturele samenleving waarin ook steeds meer exotisch voedsel op tafel komt. Wat in bepaalde culturen gemeengoed is, is niet altijd aan anderen bekend. Zo is het voor Europeanen wellicht niet vanzelfsprekend om te weten dat de cassavewortel niet zomaar rauw eetbaar is terwijl deze wortel inmiddels wel op veel markten wordt aangeboden. Al deze planten worden genoemd in het compendium, samen met de theeplant, de koffieplant, citrusvruchten en vele andere planten. De EFSA ziet het compendium als een levend document dat steeds actualisering nodig heeft naarmate er meer bekend wordt.
In 2010 en 2011 heeft de commissie die aan het compendium werkt een groot aantal nationale lijsten van verboden planten(delen) doorgewerkt. In 2012 werd het EFSA-compendium herzien en uitgebreid met twee bijlagen. De eerste geeft een lijst met *botanicals* die ergens op een nationale lijst staan maar waarbij de commissie onvoldoende wetenschappelijke documentatie kon vinden om plaatsing in het compendium te rechtvaardigen. De tweede lijst geeft *botanicals* waarover wel wetenschappelijke documentatie bestaat maar waarbij de commissie geen risicovolle stoffen of andere redenen zag om deze in het compendium op te nemen. Opgemerkt wordt dat deze twee bijlagen niet gezien mogen worden als lijsten van veilige planten omdat geen risicobeoordeling heeft plaatsgevonden.
Vooral de tweede bijlage is interessant; men vindt hierop eigenlijk een vrijwel volledig assortiment voor een traditioneel werkzame kruidengenezer. Dat ergens in Europa deze planten zonder rationele overwegingen of onderbouwing door lokale overheden verboden zijn, geeft te denken. Men gaat zich afvragen welke belangen hierbij een rol hebben gespeeld. Duidelijk is in elk geval dat de harmonisatie in deze markt nog een lange weg te gaan heeft.
De status van het EFSA-compendium is nog steeds informerend en adviserend voor de nationale overheden, het heeft geen wetgevende status.

Bron: EFSA, Parma. Compendium of botanicals reported to contain naturally occuring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. EFSA Journal 2012;10(5):2663. Verkrijgbaar via www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2663.pdf.

European Medicines Agency publiceert beoordelingsrapport *Juglans regia*

Op de website van de *European Medicines Agency* (EMA) is 15 januari 2013 een beoordelingsrapport voor een bijbehorende concept-monografie van *Juglans regia* (gedroogd blad en bereidingen daaruit) verschenen. *J. regia* (gedroogd blad) was vóór 2001 een veelgebruikt traditioneel kruidenmiddel in Nederland. In het Warenwetbesluit Kruidenpreparaten werd de plant echter als toxisch bestempeld en met uitzondering van de noten verboden. Na protest hiertegen van de NVF publiceerde het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) een onderbouwing van dit verbod. Het RIVM stelt dat *J. regia* juglon (5-hydroxy-1,4-naftochinon) bevat in alle delen van de plant, met de hoogste concentratie in de wortel. Alhoewel dit de reden vormde van het verbod, werden vervolgens de noten zonder nadere uitleg hiervan weer uitgezonderd (anders zouden een heleboel producten met walnoten uit de markt gehaald moeten worden). Het RIVM schrijft ook: 'Gezien het feit dat juglon aanwezig is in alle delen van *Juglans regia*, is het opmerkelijk dat de Commissie E-monografie onderscheid maakt tussen blad (dat positief wordt beoordeeld) en doppen (waarvan gebruik wordt afgeraden)'.
In het EMA-conceptrapport over *J. regia* is zeer veel literatuur, vooral uit de farmacie, samengebracht en hier wordt gesteld: *'There are some concerns about serious side effects with* Juglans regia *leaves due to presence of juglone. However, juglone is unstable and in dry leaves is present only in traces.'* Specifiek wordt over de veiligheid gezegd: *'There are no reports of adverse effects of walnut leaves from*

Member States. The allergic reactions in patients allergic to Juglandaceae should be considered.' De conclusie is dan ook dat '*…the benefit/risk assessment for* Juglans regia *leaves preparations is positive for use in therapeutical dosages in specific conditions of the mild superficial inflammatory conditions of skin and in excessive perspiration of hands and feet.*' Het gaat hierbij wel om uitwendig gebruik. Er kon tot 15 april op het concept gereageerd worden.
Tot slot moet worden opgemerkt dat overal in Europa mensen likeurtjes maken van de groene, onrijpe walnoten in een hoogalcoholische oplossing. Hieraan worden diverse positieve effecten toegeschreven. De kans bestaat dat daarin wel wat meer naftochinonen voorkomen, maar of deze meer schade toebrengen dan de alcohol in het drankje is niet zeker. Ook hier zal de dosis in combinatie met de bereiding en de frequentie van het gebruik bepalend zijn voor de eventuele risico's voor de consument.

Bronnen: Van de Bovenkamp M, Jeurissen SMF, Pelgrom SMGJ, Spijkerboer HN, Van Riel AJHP, De Kaste D, Baars AJ, Pronk MEJ. Beoordeling van de gezondheidsrisico's van 'verboden kruiden'. RIVM-rapport 320011002/2009. RIVM, Bilthoven 2009. EMA. Assessment report on *Juglans regia* L., folium. EMA/HMPC/346740/2011. EMA, London 2013 (beschikbaar via www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2013/01/WC500137820.pdf).

Onrust over claimswetgeving

Op 14 december 2012 trad de Europese wet op claims op voedingsmiddelen in werking en startte de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) de handhaving. Alhoewel mensen die geen warenwetproducten verkopen (bijvoorbeeld journalisten en tijdschriftredacties) eigenlijk niets te maken zouden moeten hebben met deze claimsverordening, lijkt dat in veel gevallen toch wel het geval te zijn. Diverse websites gingen op zwart (earth-matters.nl en kruidenvrouwtje.nl). De informatie die hierop werd gegeven, was niet geheel correct maar wel typerend voor het klimaat van onrust dat ontstond. Ernstiger te nemen zijn de opmerkingen en verwijten aan de NVWA die gemaakt werden op foodlog.nl dat een artikel van De Graaf overnam van de journalistenwebsite villamedia.nl.
De NVF ontving verschillende verontruste e-mails en telefoontjes van leden en de redactie legde daarom twee vragen voor aan het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) dat verantwoordelijk is voor het aansturen van de NVWA op dit gebied:
1. Is het verboden, en zo ja waarom, om met voedingsmiddelen en/of voedingsssupplementen jezelf of een ander (al dan niet tegen betaling) te genezen van ziekten of kwalen (cq deze te voorkomen of te verzachten)?
2. Is het strafbaar, en zo ja waarom,
A (website) als er *google ads* opduiken naast een artikel over warenwetkruiden dat op normale wijze (niet commercieel gestuurd) onderzoeksinformatie geeft over gezondheidseffecten van kruiden of andere natuurproducten zoals probiotica?
B (tijdschrift) als er onafhankelijke artikelen staan in een tijdschrift over gezondheidseffecten van voedingsmiddelen (knoflook, broccoli, honing) en er advertenties staan in dezelfde editie van dit tijdschrift (cq in een andere editie van hetzelfde tijdschrift) over producten zoals knoflookpillen (enzovoort) die alleen refereren aan de kwaliteit van het product (voedingsmiddel of voedingssupplement) zonder daarbij een claim te uiten?
Het antwoord van het ministerie luidde:
Voedings- en gezondheidsclaims mogen alleen gebruikt worden in relatie tot een product als volledig is voldaan aan de bepalingen van de claimsverordening (EG) 1924/2006. In artikel 1 van deze verordening is vastgelegd wat het toepassingsgebied van deze verordening is. In artikel 1 lid 2 staat dat de verordening van toepassing is op voedings- en gezondheidsclaims die in commerciële mededelingen worden gedaan, hetzij in de etikettering en presentatie van levensmiddelen, hetzij in de daarvoor gemaakte reclame, indien het gaat om levensmiddelen die bestemd zijn om als zodanig aan de eindverbruiker te worden geleverd.
Het is ter beoordeling van de NVWA of bepaalde uitingen commercieel zijn en dus binnen de reikwijdte van de verordening vallen. Omdat de specifieke omstandigheden van elke uiting anders zijn, wordt van geval tot geval gekeken of er sprake is van een commerciële context. Buiten de reikwijdte van de verordening valt in ieder geval wetenschappelijke informatie over de werking van stoffen die niet gelinkt zijn aan de verkoop/commerciële mededeling. Er mag dus wel iets over de werking van een kruid in tijdschrift/boek gepubliceerd worden dat niet past binnen de lijst van toegelaten claims van de claimsverordening, mits niet direct of indirect gekoppeld aan een commercieel product.

Meer specifiek kregen we het volgende antwoord op onze concrete vragen:
Op vraag 1: *Deze vraag heeft niets met claims/beweringen over voeding/geneesmiddelen te maken.*
Op vraag 2: *2A: De NVWA beoordeelt websites puur op de link die zij daarop ziet. Als er een commerciële link is naar een product van bijvoorbeeld dr. Vogel, dan valt het binnen de Claimsverordening. Maakt niet uit door wie of hoe dat gedaan is, met google e.d.*
2B: Informatie over de werking van knoflook in tijdschriften mag, mits niet gelinkt aan product X van bedrijf Y.

Vervolgens heeft de redactie geïnformeerd naar de richtlijnen die vanuit VWS zijn vastgesteld of geaccordeerd voor het vaststellen van een dergelijke link door de NVWA. VWS laat echter de beoordeling of er sprake is van een commerciële link naar een merk/specifiek product geheel over aan de NVWA. Deze ziet dit ruim, getuige haar informatieblad (79) aan ondernemers: 'Bepaalde uitingen van derden of journalisten over een medische werking van een ongeregistreerd geneesmiddel, kunnen namelijk als reclame gezien worden, zelfs wanneer deze personen geen enkele band met de verhandelaar van het product hebben. Het blijkt dus dat een 'onafhankelijke derde' wel geacht kan worden reclame te maken voor een ongeregistreerd geneesmiddel. (…) Het is tevens van ondergeschikt belang of het product de geclaimde geneeskrachtige werking ook daadwerkelijk heeft. De wetgever wil hiermee de consument beschermen tegen onvoldoende werkzame geneesmiddelen en wil daarbij voorkomen dat dergelijke producten in plaats van adequate middelen worden gebruikt.'
Wat betreft dit tijdschrift kan dit erop neerkomen dat er een verlies aan advertentie-inkomsten zou kunnen ontstaan. Ondanks dat onze redactie-activiteiten volledig (product)onafhankelijk en wetenschappelijk van karakter zijn, zullen in bepaalde gevallen advertenties moeten worden geschrapt of doorgeschoven omdat er nieuws of kopij is rond een in een advertentie genoemd voedingsmiddel of -ingrediënt. Het alternatief, dat om die reden nieuws of

kopij zou moeten verdwijnen, lijkt ons niet van toepassing. Overigens zijn er wat dit betreft geen problemen rond (advertenties voor) geregistreerde kruidengeneesmiddelen. Daarnaast zijn de toegelaten (cq verboden) claims rond kruiden nu nog niet bekend. De discussie hierover loopt nog in de EFSA. Tot die tijd zijn niet-medische gezondheidsclaims nog wel toegestaan bij kruiden, mits een en ander voldoet aan het Warenwetbesluit Kruidenpreparaten.

Bronnen:
De Graaf T. 8 november 2012. Opinie. Gepubliceerd op www.villamedia.nl/opinie/bericht/de-nvwa-muilkorft-journalisten/. NVWA informatieblad 79; januari 2013, gepubliceerd op www.vwa.nl/onderwerpen/regels-voor-ondernemers-eten-en-drinken/dossier/claims/welke-regels-gelden-voor-medische-claims. Correspondentie van de redactie met het Ministerie van VWS.

Nobelprijswinnaar waarschuwt: multivitaminen en antioxidanten bevorderen mogelijk de groei van kanker bij patiënten met een vergevorderde vorm van kanker
Nobelprijswinnaar James Watson – samen met Francis Crick ontdekker van de dubbele-helixstructuur van DNA in 1953 – schrijft in een recente publicatie dat voedingssupplementen met antioxidanten zoals vitamine A, C en E mogelijk de progressie van gemetastaseerde vormen van kanker zouden kunnen bevorderen en de kans op overleving of de levensverwachting zouden kunnen verminderen. Recente studies suggereren namelijk dat veel onbehandelbare en vergevorderde stadia van kanker hoge concentraties antioxidanten bevatten. Ook is er inmiddels een groot aantal interventiestudies met antioxidanten gedaan waarin geen duidelijke effectiviteit bij de preventie van gastro-intestinale kanker of verlaging van de mortaliteit is waargenomen. Volgens Watson zijn er zelfs aanwijzingen dat antioxidanten de overlevingstijd enigszins bekorten. Het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt, wordt door Watson verklaard vanuit recente inzichten in biochemische en cellulaire processen die leiden tot metastasering en therapieresistentie van kanker. Een centrale rol hierbij dicht Watson toe aan het eiwit p53, dat kankercellen aanzet tot geprogrammeerde celdood (apoptose) en reactieve zuurstofmetabolieten. Het eiwit p53 induceert namelijk de aanmaak van een aantal andere eiwitten die een belangrijke rol spelen bij de vorming van reactieve zuurstofmetabolieten (waaronder chinon-oxidoreductase) maar ook van enkele mitochondriale eiwitten die betrokken zijn bij de opeenvolgende proteolytische stappen tijdens apoptose. Reactieve zuurstofmetabolieten kunnen ook direct apoptose induceren in door oxidatieve stress beschadigde cellen. De rol van reactieve zuurstofmetabolieten bij apoptose wordt bevestigd door het feit dat veel antikankerbehandelingen reactieve zuurstofmetabolieten genereren en antioxidanten juist de door reactieve zuurstofmetabolieten geïnduceerde apoptose remmen. Omgekeerd laten stoffen die de natuurlijke, cellulaire antioxidantconcentraties verlagen ten slotte de celdood door apoptose toenemen.

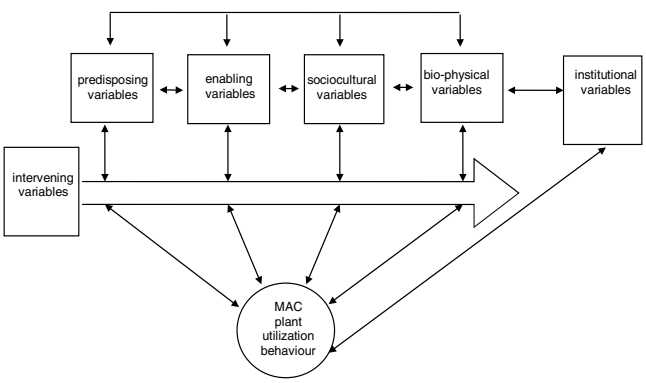
Bronnen: Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. Open Biol. 2013;3:120144. NUTRAingredients.com, 17 januari 2013 (www.nutraingredients.com/Research/Multivitamins-and-antioxidants-may-promote-cancer-growth-in-late-stage-patients-warns-Nobel-laureate).

Uitgebreide systeembiologische kaart van het humane metabolisme geeft meer inzicht in de rol van voeding op de gezondheid.
Een grote groep van systeembiologen heeft onlangs een nieuw model ontwikkeld van het humane metabolisme. In dit model worden bijna 7.500 reacties beschreven met meer dan 5.000 metabolieten, waarvan er ruim 2.600 een uniek karakter hebben. Eén van de participerende onderzoekers is Hans Westerhoff van de Universiteit van Amsterdam. Volgens Westerhoff is deze stofwisselingskaart een goede aanvulling op het menselijke genoom en biedt het in theorie de mogelijkheid om in de toekomst te zien voor welke ziekten iemand aanleg heeft en welke voedingsmiddelen of geneesmiddelen deze ziekten kunnen voorkomen of genezen. Volgens Westerhoff kunnen geneesmiddelen met deze kaart steeds meer geïndividualiseerd worden toegepast maar zou ook vaker aangepaste voeding in een vroeg stadium van ziekte de afhankelijkheid van geneesmiddelen kunnen verminderen.

Bronnen: Thiele I, *et al*. A community-driven global reconstruction of human metabolism. Nature Biotechnol 2013;doi:10.1038/nbt.2488. Volkskrant, 4 maart 2013 (www.volkskrant.nl/vk/nl/5270/Zorg/article/detail/3403390/2013/03/04/Routeplanner-menselijk-lichaam-brengt-revolutie-teweeg-in-geneeskunde.dhtml).

Correcties en aanvullingen

In de vorige editie (jg 26 nr 1) was door een zetfout de figuur op pag. 5 onleesbaar.



Hierbij opnieuw deze figuur, met onderschrift.

Figuur 1. Het Leidse model voor het onderzoek naar gedrag in relatie tot het gebruik van MAC-planten met behulp van statistische (multivariate) analysemethoden [3].

3. Slikkerveer LJ. The challenge of non-experimental validation of MAC Plants – Towards a multivariate model of transcultural utilisation of medicinal, aromatic and cosmetic plants. In; Bogers RJ, Craker LE, Lange D (red.) Proceedings of the Frontis Workshop on Medicinal and Aromatic Plants, Wageningen, The Netherlands, 17-20 April 2005. Wageningen UR Frontis Series, deel 17. Springer Verlag, Berlin 2006.