

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΟΚΑΣ (*Eruca sativa*) ΚΑΙ
ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ»**

της

ΠΑΠΠΑ ΕΥΘΥΜΙΑ - ΗΡΩ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΟΚΑΣ (*Eruca sativa*)
ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΓΛΥΚΟΣΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ»**

**“EFFECTS OF ERUCA EXTRACTS AND ISOLATED GLUKOSINOLATES
IN CANCER CELL LINES”**

Περίληψη

Τα κραμβοειδή λαχανικά (*E. sativa*, *B. rapa*) είναι ιδιαίτερα γνωστά για τις θρεπτικές τους ιδιότητες, καθώς αποτελούν καλή πηγή βιταμίνης Α και C, περιέχουν διαιτητικές διαλυτές ίνες, φολικό οξύ, απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά και είναι χαμηλά σε θερμίδες και λίπος. Μια από τις κύριες κατηγορίες δραστικών ενώσεων που περιέχουν είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες και ειδικότερα τα γλυκοσινολικά οξέα τα οποία έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Η σημαντικότερη δράση των γλυκοσινολικών οξέων στην ανθρώπινη υγεία είναι η προστασία στην ανάπτυξη καρκίνου. Οι στόχοι αναπαραγωγής για τις καλλιέργειες των κραμβοειδών περιλαμβάνουν την ενίσχυση των ευεργετικών γλυκοσινολικών κάτι που επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της λίπανσης κατά την περίοδο καλλιέργειας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων ρόκας που καλλιεργήθηκε με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους λίπανσης όσον αφορά την παροχή αζώτου και θείου, στην ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της βιοδοκιμής ΧΤΤ που βασίζεται στη δραστικότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν την ανασταλτική δράση των γλυκοσινολικών οξέων στην ανάπτυξη των καρκινικών σειρών. Ακόμη, ενισχύουν την υπόθεση ότι οι διαφορές στην λίπανση κατά την καλλιέργεια του φυτού επηρεάζει την ανάπτυξη γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό και επομένως την βιολογική τους αξία, καθώς διαφορετικά εκχυλίσματα προκαλούσαν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικό βαθμό.

Abstract

The cabbage vegetables (*E. sativa*, *B. rapa*) are particularly known for their nutritional value, as they are a good source of vitamin A and C, contain soluble dietary fiber, folic acid, essential micronutrients and are low in calories and fat. They also contain secondary metabolites such as glucosinolates which have beneficial properties for the human health. One of the beneficial effects of glucosinolates is their cancer-protective effect. The objectives for the breeding of crops includes cabbage enhancement with beneficial glucosinolates, this is achieved with modifications of lubrication during the cultivation period. At the research conducted, we studied the effects of rocket extracts cultivated in four different ways of fertilization for N and S in the growth of HeLa cancer cell lines. The study was conducted using the XTT Bioassay based on the activity of mitochondrial enzymes. The results confirm the inhibitory effect of glucosinolates in growth of HeLa cancer cell lines. Furthermore, the results support the hypothesis that differences in lubrication during cultivation of the plant affects the growth of glucosinolates in plant and therefore its biological value, as different extracts causing inhibition of cell proliferation on cancer cell lines to a different degree.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας
Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Περιεχόμενα

Περίληψη	Σελ. 2
A. Εισαγωγή	Σελ. 8
1. Η ρόκα	
1.α Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού <i>Eruca sativa</i> ή ρόκα	Σελ. 9
1.β Μορφολογία	Σελ. 10
1.γ Ανάπτυξη μεταλλάξεων και πολυπλοειδία	Σελ. 11
2. Δευτερογενείς μεταβολίτες	
2.α Τα γλυκοσινολικά οξέα	Σελ. 12
2.β Βιοχημική Σύσταση των γλυκοσινολικών οξέων	Σελ. 14
3. Καρκίνος	
3.α Γενικά	Σελ. 19
3.β Επιδημιολογικά στοιχεία	Σελ. 19
3.γ Η καρκινοπροστατευτική δράση των γλυκοσινολικών οξέων	Σελ. 22
4. Λίπανση	
4.α Γενικά	Σελ. 23
4.β Η σημασία του Αζώτου (N) και Θείου (S) στην ανάπτυξη του φυτού	Σελ. 23
4.γ Επίδραση της λίπανσης σε N και S στη σύσταση ΓΚΣ των φυτών	Σελ. 24
Σκοπός	Σελ. 25
B. Υλικά και μέθοδοι	
1. Φυτικός ιστός	Σελ. 26
2. Υλικά μεταχείρισης καρκινικών σειρών	Σελ. 27

3. Εκχύλιση δευτερογενών μεταβολιτών	Σελ. 28
4. Καρκινική σειρά HeLa	
4.α Πρωτόκολλο εργασίας με κύτταρα HeLa	Σελ. 31
4.β Πάγωμα κυττάρων HeLa για μακροπρόθεσμη αποθήκευση	Σελ. 32
4.γ Απόψυξη αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων HeLa	Σελ. 33
5. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ	
5.α Γενικά για τη μέθοδο	Σελ. 35
5.β Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας	Σελ. 36
6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	Σελ. 38
Γ. Αποτελέσματα συζήτησης	Σελ. 40
1. Επίδραση των εκχυλισμάτων ρόκας στην ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa	Σελ. 40
Συμπεράσματα	Σελ. 42
Βιβλιογραφία	Σελ. 43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο συντάκτης επιθυμεί να ευχαριστήσει την κα Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την υπομονή της και την ανταπόκριση της σε κάθε μου έκκληση για βοήθεια, την κα Λιαδάκη Καλλιόπη για την μεταφορά των γνώσεων της στην καλλιέργεια των κυττάρων και την γραμματεία του ΠΜΣ του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κα Ιωάννα Στρούλια για την εξαιρετική συνεργασία και ετοιμότητα της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους που με βοήθησαν ηθικά και οικονομικά να ολοκληρώσω το ΠΜΣ καθώς και όσους με συμβούλευσαν να μην εγκαταλείψω την προσπάθεια και να ολοκληρώσω το πρόγραμμα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές και το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας Φυτών που με βοήθησε να κατανοήσω και να αποκτήσω εμπειρία στον τρόπο λειτουργίας του.

Εισαγωγή

Η παρούσα εργασία έχει σκοπό να ερευνήσει την επίδραση εκχυλισμάτων ρόκας σε καρκινικές σειρές HeLa. Ξεκινώντας θα γίνει μια αναφορά στην προέλευση, τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά του φυτού ρόκα που είναι και η πρώτη ύλη για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης. Στη συνέχεια, θα δούμε τι είδους ενώσεις είναι τα γλυκοσινολικά οξέα, ποιά είναι η φυσική τους λειτουργία στο φυτό και πως απελευθερώνονται. Ακόμη, θα γίνει σχετική αναφορά στην θετική δράση που έχουν τα γλυκοσινολικά οξέα στην υγεία του ανθρώπου σύμφωνα με τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, ειδικότερα στην αντιμετώπιση και προστασία από τον καρκίνο του επιθηλίου, του μαστού και του προστάτη. Σύντομη αναφορά θα γίνει και στον καρκίνο ως ασθένεια και ειδικότερα στις μορφές καρκίνου του επιθηλίου, του μαστού και του προστάτη με παράθεση επιδημιολογικών στοιχείων. Τέλος, θεωρείται σκόπιμο να γίνει αναφορά στη σημασία της λίπανσης του φυτού για την ανάπτυξη των γλυκοσινολικών οξέων και τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει η ρύθμιση της λίπανσης στη βιολογική αξία της καλλιέργειας. Στο δεύτερο κεφάλαιο θα γίνει επεξήγηση της πειραματικής διαδικασίας- μεθόδου που ακολουθήθηκε, από το αρχικό στάδιο της εκχύλισης και της καλλιέργειας των καρκινικών σειρών μέχρι την δοκιμή των εκχυλισμάτων στην καρκινική σειρά HeLa. Προχωρώντας, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της έρευνας και θα γίνει συζήτηση των συμπερασμάτων.

Η ΡΟΚΑ

1.α Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού *Eruca sativa* ή Ρόκα.

Το φυτό *Eruca sativa*, (L.) Mill είναι ένα χαμηλής ανάπτυξης φυτό με ετήσιο κύκλο ζωής, ανοιχτής καλλιέργειας με σποροφυτικού τύπου αυτό-ασυμβατότητα. Ανήκει στην τάξη των Brassicales, οικογένεια Brassicaceae το γένος *Eruca*, είδος *E. sativa*. Τα φύλλα της έχουν μια χαρακτηριστική πικάντικη και λίγο πικρή γεύση. Θεωρείται, πολύ καλό λαχανικό για ωμές σαλάτες όταν συνοδεύεται με άλλα λαχανικά. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι και Ρωμαίοι θεωρούσαν τα φύλλα της Ρόκα, αφροδισιακά γι αυτό και τα χρησιμοποιούσαν στις σαλάτες. Η Ρόκα πιστεύεται ότι προέρχεται από την Νότια Ευρώπη όπου καλλιεργούνταν συστηματικά και την Βόρεια Αφρική (Bailei, 1949; Prakash, 1980). Το φυτό μεταφέρθηκε στην Αμερική μέσο της μετανάστευσης πριν το 1854 αλλά δεν έγινε ευρέως αποδεκτή (Sturtevan 1915).

Η ταξονομική της θέση αρχικά ήταν περίπλοκη καθώς ταξινομήθηκε στο γένος *Brassica* και ονομάστηκε *Brassica erucooides* (Roxburgh, 1832) ενώ ο Hooker (1872) αναφερόταν σ' αυτή ως *Brassica eruca*. Ο Plaxton (Hereman 1868) την περιγράφει ως *Eruca turnefort* και παραθέτει τρία είδη α. *Eruca hispida*, β. *Eruca sativa* και γ. *Eruca vesicaria*. Στο είδος *Eruca sativa* κατατάχθηκαν επτά (7) υποείδη με τις ονομασίες *alba-glabra*, *alba-pilosa*, *erucooides*, *exotica*, *flava glabra*, *flava pilosa* και *turgida*. Στη συνέχεια ο Plaxton (Hereman, 1868) δήλωσε ότι από τα τρία αυτά είδη η *Eruca hispida* κατάγεται από τη Νάπολη της Ιταλίας, η *Eruca vesicaria* από την Ισπανία ενώ τα υποείδη της *Eruca sativa* από την Νότια Ευρώπη. Τα παραπάνω είδη με δυσκολία χαρακτηρίζονται ετήσια και έχουν λευκά ή κίτρινα άνθη.

Επικρατούσε σύγχυση με τα διαφορετικά είδη του γένους *Eruca*, ο Gomez Campo (1980) αναφέρει τη διατήρηση τριών (3) ειδών με τις ονομασίες *Eruca veseicaria* (L) Cav., από την Zaragoza της Ισπανίας, *Eruca pinatifida* (Desf.) Pomel από το Μαρόκο και *Eruca sativa* (Miller) από την Αλεξάνδρεια της Αιγύπτου. Τελικά ο Vesperinas (1995) τεκμηρίωσε με διειδικές διασταυρώσεις την διαφορετική φύση μεταξύ της *Eruca sativa* και της *Eruca vesicaria* ενώ ο Miller έβαλε τη Ρόκα σε διαφορετικό γένος (Tutin et al., 1964).

1.β Μορφολογία

Η ρόκα είναι μονοετές φυτό που φτάνει το ενάμησι μέτρο (1.5) ύψος). Η πλήρης περιγραφή του φυτού δώθηκε από τον Singh (1958). Με την πρώτη ματιά το φυτό μοιάζει με τη μουστάρδα αλλά ο βλαστός του μπορεί να βοηθήσει να το διακρίνουμε από αυτή. Η ρόκα έχει πιο ανοιχτό πράσινο χρώμα συγκριτικά με τη μουστάρδα. Ο βλαστός της είναι περίπου 2. 5 εκατοστά σε μήκος με μια επίπεδη χωρίς κουκούτσια κορυφή της οποίας το πλάτος είναι περίπου το μισό μέγεθος των βολβών(Singh, 1958). Τα λουλούδια της ρόκας ανοίγουν κυρίως το πρωί όταν έχει ζεστάνει λίγο η θερμοκρασία, περίπου κατά τις 09:00 π.μ. Το άνοιγμα των λουλουδιων μπορεί να καθυστερήσει κατά τη διάρκεια των κρύων περιόδων, ή τις συννεφιασμένες ή βροχερές ημέρες.

Το περιεχόμενο της ρόκα σε έλαια κυμαίνεται από 30-35% με κυριότερο συστατικό ελαίου να είναι το ερουκικό οξύ (περίπου 46%). Στους σπόρους της ρόκας η συγκέντρωση σε έλαια είναι περίπου 27,67% (Gulfranz et al. 2011).. Οι Leonardis et al. (1997), μελέτησαν τη μορφολογία των σπόρων χρησιμοποιώντας εξειδικευμένες τεχνικές και μικροσκόπιο σάρωσης. Ανέφεραν ξεκάθαρες διαφορές στο καρπούς των διάφορων ειδών του γένους *Eruca* που μελετήθηκαν. Οι σπόροι παρουσίασαν μεγαλύτερη μορφοβιομετρική διειδική ομοιογένεια που σαφώς διακρίνει τα είδη της *Eruca* από τις διπλοταξίες. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό διάκρισης από αυτά τα δύο γένη αντιπροσωπεύεται από το μήκος του σπόρου, το οποίο ποικίλλει από 1.30 έως 1.55 mm στην *Eruca*.



Εικόνα 1.1 & 1.2 Το φυτό ρόκα φύλλα βλαστός και άνθη.

1.γ Ανάπτυξη μεταλλάξεων και πολυπλοειδία

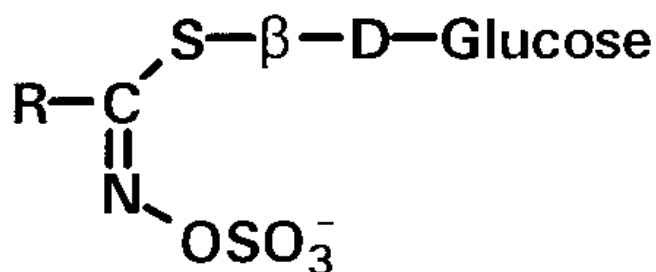
Μετάλλαξη αναπαραγωγής δεν επιχειρήθηκε στην καλλιέργεια αυτή ακόμη, παρόλαυτά κάποιες αναφορές σχετικά με την πολυπλοειδία είναι διαθέσιμες. Τετραπλοειδή φυτά που προέκυψαν με μεταχείριση με κολχικίνη είχαν μεγαλύτερο μίσχο, σπόρους, στόματα και κόκκους γύρης (Singh, 1958; Labana, 1977). Η τετραπλοειδία βρέθηκε να είναι μειοτικά ασταθής, έχοντας ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αδρανών γαμετών με ασύμμετρο αριθμό χρωμοσωμάτων.

2. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

2.α Τα γλυκοσινολικά οξέα

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι μια οικογένεια περίπου 120 φυτικών ενώσεων (Fahey et al.2001). Κάθε γλυκοσινολικό περιέχει μια θειο-γλυκόνη, ένα άζωτο συνδεδεμένο με θειικό άλας και μια ποικίλη πλευρική αλυσίδα η οποία μπορεί να περιέχει αλειφατικές, ινδολικές ή αρωματικές ομάδες. Τα γλυκοσινολικά αποθηκεύονται στα χυμοτόπια του φυτού και με ρήξη των κυττάρων, έρχονται σε επαφή με τη μυροσινάση, η οποία είναι β-θειογλυκοσιδάση και καταλύει το θειογλυκοσιδικό δεσμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση αγλυκόνης και την επακόλουθη αναδιοργάνωση σε βιο-ενεργές ενώσεις με τη μορφή ισοθεικυάνων, νιτριλίων και οξαλοζιδιν-2 θειόνες. Ο τύπος των ενώσεων που σχηματίζονται εξαρτάται από τη δομή του αρχικού γλυκοσινολικού, των συνθηκών αντίδρασης και την παρουσία συν-παραγόντων.

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, ανήκουν στην ομάδα των αζωτούχων ενώσεων και η βιολογική δραστηριότητα τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή της πλευρικής αλυσίδας (Bidart-Bouzat et al. 2008). Ακόμη, υπάρχει απόδειξη από πειράματα στο εργαστήριο και στο πεδίο ότι διαφορές στην ποσότητα και ποιότητα των γλυκοσινολικών μπορούν να μεσολαβήσουν στις αλληλεπιδράσεις φυτού-εντόμου επηρεάζοντας τη συμπεριφορά σίτισης των εντόμων και τα επίπεδα βλάβης του φυτού (Mauricio 1998; Li et al. 2000; Lambrix et al. 2001; Barth and Jander 2006; Zhang et al. 2006).



Εικόνα 1.3 Δομή γλυκοσινολικού οξέος. Όπου R η πλευρική αλυσίδα.

Τα γλυκοσινολικά οξέα απαντώνται στο σύνολο σε δεκαπέντε (15) βοτανικές οικογένειες. Οι οικογένειες αυτές είναι *Akaniaceae*, *Bataceae*, *Brassicaceae*, *Bretschneideraceae*, *Capparaceae*, *Caricaceae*, *Euphorbiaceae*,

Gyrostemonaceae, *Limnanthaceae*, *Moringaceae*, *Pentadiplandraceae*, *Resedaceae*, *Salvodoraceae*, *Tropaeolaceae* και *Tovariaceae*. Τα είδη των φυτών στα οποία υπάρχουν γλυκοσινολικά οξέα, σημαντικά για τη διατροφή των ζώων και του ανθρώπου ανήκουν στην οικογένεια των κραμβοειδών (ή σταυρανθών) και στο φυτό – μοντέλο *Arabidopsis thaliana*.

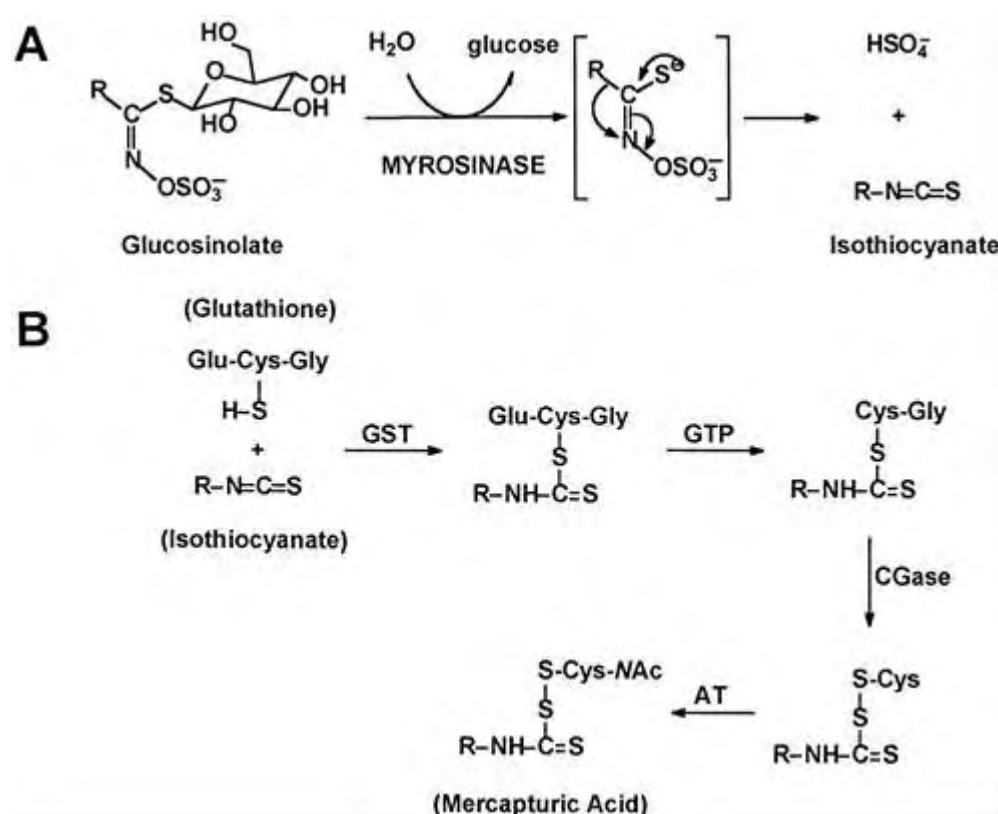
Η οικογένεια των κραμβοειδών περιλαμβάνει την ελαιοκράμβη, το λάχανο, τα λαχανάκια Βρυξελών, το μπρόκολο, το κουνουπίδι, τα γογγύλια, το κινέζικο λάχανο, τους σπόρους μουστάρδας, τα ραπανάκια και τη ρόκα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά την επέμβαση στον ιστό του φυτού τα γλυκοσινολικά οξέα υδρολύονται από ενδογενείς β-θειογλυκοσιδάσες (μυροσινάσες), αποδίδοντας ισοθειοκυάνες, νιτρίλια ή άλλα προϊόντα (Petersen et al. 2002). Το σύστημα γλυκοσινολικών-μυροσινάσης πιστεύεται ότι έχει πολλαπλές λειτουργίες στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παρασίτων, παρέχοντας όχι μόνο κίνητρα διατροφής και εναπόθεσης αυγών αλλά και ενώσεις που ενεργούν ως τοξίνες και αποτρεπτικοί παράγοντες σίτισης για τα φυτοφάγα έντομα.

Τα γλυκοσινολικά οξέα χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο ως φυσικά εντομοαπωθητικά, ως αρωματικές ενώσεις και ως καρκινοπροστατευτικές ενώσεις. Η χρήση των γλυκοσινολικών οξέων ως φυσικό εντομοαπωθητικό ονομάζεται βιο-υποκαπνισμός και είναι γνωστή ως διαδικασία καταστολής των παρασίτων και των ασθενειών του εδάφους που προκύπτουν από πτητικά προϊόντα υδρόλυσης, κυρίως ισοθειοκυανίνες, που απελευθερώνονται στο χώμα μετά την ενσωμάτωση φυτικών ιστών που περιέχουν γλυκοσινολικά (Gimsing et al. 2009).

Όσον αφορά τη σίτιση των ζώων, η παρουσία γλυκοσινολικών στους σπόρους των σταυρανθών μειώνει σημαντικά την ποιότητα του σπόρου που μένει, για χρήση σε τροφή, έπειτα από την αφαίρεση των ελαίων. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία ορισμένων γλυκοσινολικών που διασπώνται και δίνουν προϊόντα που προκαλούν βρογχοκήλη στα ζώα. Η πιο αξιοσημείωτη από αυτές είναι η οξαζολιδινο-2-θειόνη που προέρχεται από το 2-υδροξυ-3-βουτενυλ γλυκοσινολικό, η οποία συσσωρεύεται στους σπόρους της ελαιοκράμβης (*B.napus*). Εκτός από τις αλλαγές στο μέγεθος, τη δομή και

τη λειτουργία του θυρεοειδούς, η σίτιση των ζώων με κραμβέλαιο μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του ήπατος και των νεφρών. Η ακριβής αιτία αυτού δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά μπορεί να σχετίζεται είτε με την παρουσία άθικτων γλυκοσινολικών, ή με την παραγωγή νιτριλίων στον πεπτικό σωλήνα (Griffiths et al. 1998).



Εικόνα 1.4 σχηματική περιγραφή του συστήματος γλυκοσινολικών- μυροσινάσης και των προϊόντων διάσπασης των γλυκοσινολικών από τη μυροσινάση.

2.β Βιοχημική σύσταση των γλυκοσινολικών οξέων.

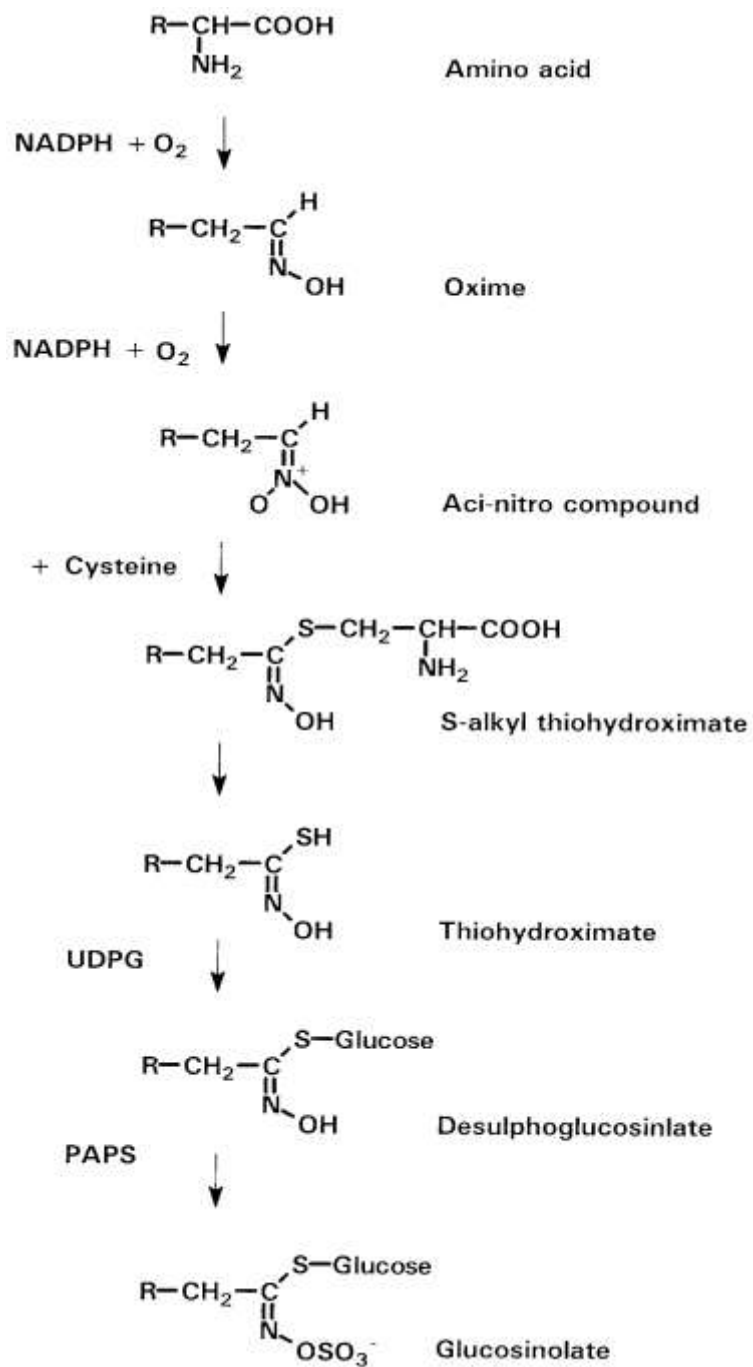
Η βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών όπως παρατηρήθηκε στο φυτό- πρότυπο *Arabidopsis thaliana* ακολουθεί τρία στάδια, (α) επιμήκυνση της αλυσίδας των πρόδρομων αμινοξέων, (β) σχηματισμός της γλυκόνης και (γ) δευτερεύουσες τροποποιήσεις στην πλευρική αλυσίδα μετά τη βιοσύνθεση του γλυκοσινολικού. Για κάθε ένα από αυτά τα στάδια, μόνο μερικά ένζυμα έχουν χαρακτηριστεί ή μερικά γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί και διάφορα βήματα στο βιοχημικό μονοπάτι παραμένουν θεωρητικά (Halkier and Du L.

1997). Πολλά γλυκοσινολικά συντίθενται από επιμήκεις αλυσίδες που περιέχουν βαλίνη, φαινυλαλανίνη και μεθειονίνη. Βιοχημικές μελέτες με χορήγηση σημασμένου άνθρακα και αμινοξέα σε φυτά δείχνουν ότι η επιμήκυνση του αμινοξέος είναι παρόμοια με τη σύνθεση της λευκίνης από βαλίνη και οξύ. Γίνεται τρανσαμίνωση του αμινοξέος και παράγεται ένα ακετοξύ, ακολουθεί συμπύκνωση με ακετυλο CoA, και ισομερίωση, συμπεριλαμβανομένης της αλλαγής στην ομάδα υδροξυλίου και οξειδωση ώστε να οδηγήσει σε ένα επίμηκες κετοξύ, το οποίο τρανσαμινώνεται για να σχηματίσει το επίμηκες αμινοξύ. Η επιμήκυνση της αλυσίδας συμβαίνει στους χλωροπλάστες όπου το αμινοξύ υποβάλλεται σε σταδιακές επιμηκύνσεις αλυσίδας για την παραγωγή πρόδρομων αμινοξέων με ποικίλο αριθμό αλυσίδας ανθράκων 3–8 (C3-C8) (Halkier and Gershenzon 2006 and Sonderby et al. 2010).

β. Βιοσύνθεση της γλυκόνης- το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεση της γλυκόνης είναι η μετατροπή του αμινοξέος σε μια αλδοξίμη ($RCH=NOH$). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικά ένζυμα εμπλέκονται στη μετατροπή των διαφόρων αμινοξέων. Το πιο καλά χαρακτηρισμένο από τα ένζυμα, είναι οι μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 οι οποίες μετατρέπουν τυροσίνη και φαινυλαλανίνη στις αντίστοιχες τους αλδοξίμες (Du L et al. 1995 & Du L. and Halkier 1997). Η μετατροπή των μορφών της επιμήκους αλυσίδας μεθειονίνης και φαινυλαλανίνης καταλύεται από φλαβίνες, που περιέχουν μονοξυγενάσες, ενώ η μετατροπή της τρυπτοφάνης σε ινδολική ακεταλδοξίμη, ως πρόδρομος των ινδολικών γλυκοσινολικών, διαμεσολαβείται από τις πυροξιδάσες που δεσμεύονται στη μεμβράνη του πλάσματος (Mithen R., 2001).



Τα ενδιάμεσα προϊόντα, μεταξύ αλδοξιμών και θειουδροαλδοξιμων δεν έχουν προσδιοριστεί και αυτό το τμήμα του μονοπατιού είναι καθαρά υποθετικό. Τα τελικά βήματα στη βιοσύνθεση της γλυκόνης είναι και το πιο κατανοητά. Η θειουδροξυλαμίνη S-γλυκοσυλιωνεται από μια διαλυτή UDPG: θειουδροαλδοξίμη γλυκοσυλτρασφεράση (S-GT) για να παράγει ένα δισουλφογλυκοσινολικό. Αυτό καθίσταται θειωμένο από μια διαλυτή 3 - φωσφοαδενοσύνη 5 - φωσφοσουλφόνη (PAPS): δισουλφογλυκοσινολική σουλφοτρασφεράση.

γ. **Δευτερεύουσες τροποποιήσεις**- μετά τη βιοσύνθεση του μεθυλθειοαλκυλγλυκοσινολικού από μεθειονίνη, η πλευρική αλυσίδα μπορεί να υποστεί διάφορες τροποποιήσεις. Εν συντομία, οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν μια οξειδωση του μεθυλθείου σε ημι-μεθυλοσουλφινυλη από μια μονοξυγενάση φλαβίνης για να σχηματίσει το μεθυλσουλφινυλγλυκοσινολικό ή κοινός σουλφυνικό γλυκοσινολικό οξύ. Αναλυτικότερα, το προτεινόμενο μονοπάτι περιλαμβάνει μια αρχική οξειδωση σε μεθυλσουλφινυλαλκυλ (και κατά πάσα πιθανότητα, μεθυλσουλφονυλαλκυλγλυκοσινολικά σε ορισμένα είδη), ακολουθούμενη από την αφαίρεση της μεθυλσουλφινυλ ομάδας και αποκορεσμό που οδηγεί στη δημιουργία αλκενυλγλυκοσινολικών και μετέπειτα υδροξυλίωση για να καταλήξει σε υδροξυαλκενυλγλυκοσινολικά (Giamoustaris et al. 1996 and Parkin et al. 1994).



Εικόνα 1.5 Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών.

(a)

Amino acid precursor	Glucosinolate structure	Amino acid chain elongation
Methionine	Methylthioalkyl	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1 - 8$
	Methylsulphinylalkyl	$\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1 - 9$
	Methylsulphonylalkyl	$\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1, 2, 6$
	4-Methylsulphinyl-3-butenyl	$\text{CH}_3\text{-SO-CH=CH-(CH}_2\text{)}_2\text{-GSL}$
	Alkenyl	$\text{CH}_2\text{=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1, 2, 3$
	2-Hydroxy-3-butenyl	$\text{CH}_2\text{=CH-CH(OH)-CH}_2\text{-GSL}$
	2-Hydroxy-4-pentenyl	$\text{CH}_2\text{=CH-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-GSL}$
	Hydroxalkyl	$\text{CH}_2\text{(OH)-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1, 2, 3$
Benzoyloxyalkyl	 $\text{C-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 1 - 4$	
Valine	$\text{CH}_3\text{-CH(CH}_3\text{)-[CH}_2\text{]}_n\text{-GSL}$ $n = 0 - 2$	
Isoleucine	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-[CH}_2\text{]}_n\text{-GSL}$ $n = 0, 1$	
Phenylalanine	 $\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-GSL}$ $n = 0 - 4$	

Εικόνα 1.6

(α) παραδείγματα γλυκοσινολικών που προέρχονται από επιμήκη αμινοξέα, το n δηλώνει τον αριθμό των επιπλέον του ομάδων μεθυλενίου. (β) παραδείγματα γλυκοσινολικών που προέρχονται από μη επιμήκης αλυσίδες αμινοξέων.

3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.α Γενικά

Καρκίνος είναι η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί μετάλλαξη στο σώμα. Τα καρκινικά κύτταρα ονομάζεται επίσης κακοήθη κύτταρα και μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος και να δημιουργώντας μεταστάσεις μέσω των συστημάτων του αίματος και της λέμφου. Ο καρκίνος δεν είναι μόνο μία ασθένεια, αλλά πολλές ασθένειες. Υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου. Οι περισσότεροι καρκίνοι παίρνουν το όνομα τους από το όργανο ή τον τύπο του κυττάρου στο οποίο αρχίζουν.

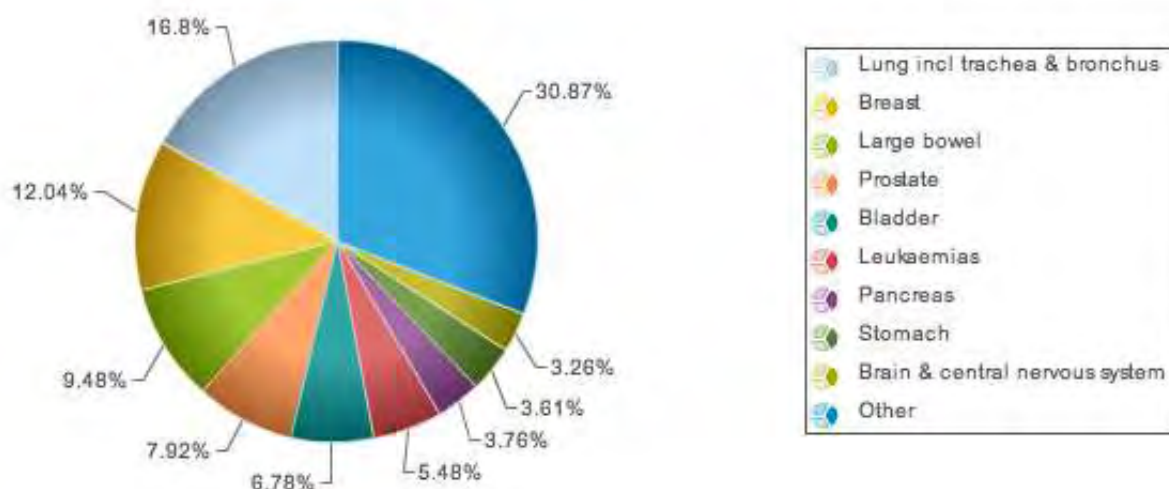
Όλοι οι καρκίνοι ξεκινούν στα κύτταρα, βασική μονάδα του σώματος και της ζωής. Για την κατανόηση του καρκίνου, είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε τι συμβαίνει όταν τα φυσιολογικά κύτταρα γίνονται καρκινικά κύτταρα. Το σώμα αποτελείται από πολλούς τύπους κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται με ελεγχόμενο τρόπο για να παράγουν περισσότερα κύτταρα, όπως είναι απαραίτητο για να διατηρηθεί το σώμα υγιές. Όταν τα κύτταρα γερνάνε ή φθείρονται, πεθαίνουν και αντικαθίστανται από νέα κύτταρα, η διαδικασία αυτή ονομάζεται απόπτωση των κυττάρων.

Ωστόσο, μερικές φορές αυτή η διαδικασία δεν ακολουθεί τη φυσιολογική ροή. Το γενετικό υλικό (DNA) ενός κυττάρου μπορεί να υποστεί βλάβη ή να αλλάξει, μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Όταν συμβαίνει αυτό, τα κύτταρα δεν πεθαίνουν όταν πρέπει και παράγουν νέα κύτταρα όταν το σώμα δεν τα χρειάζεται. Τα επιπλέον κύτταρα μπορεί να σχηματίσουν μια μάζα ιστού που ονομάζεται όγκος.

3.β Επιδημιολογικά στοιχεία

Στο παρακάτω σχήμα μπορούμε να δούμε τη συχνότητα περιστατικών ανα είδος καρκίνου στον πληθυσμό της Ελλάδος για το έτος 2012.

Estimated incidence for both sexes in Greece, 2012



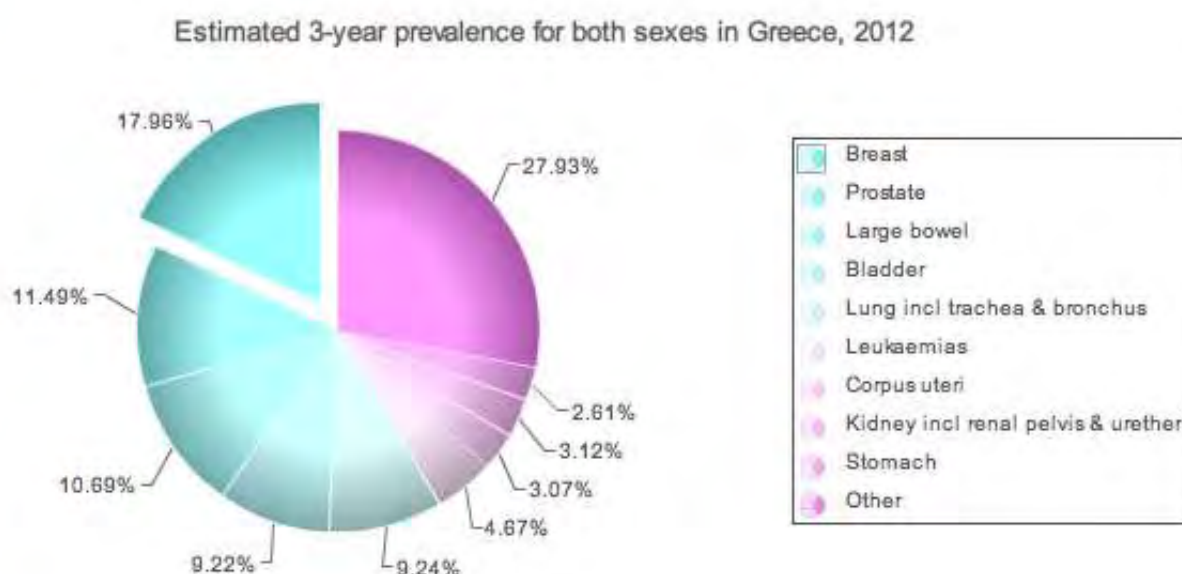
Εικόνα 1.7 Εκτιμώμενη συχνότητα καρκίνου για τα δυο φύλλα στην Ελλάδα, 2012.

Συχνότητα είναι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων που προκύπτουν σε μια δεδομένη χρονική περίοδο σε καθορισμένο πληθυσμό. Αυτή η πληροφορία μπορεί να γίνει μόνο από τα πληθυσμιακά μητρώα καρκίνου. Ακόμη, μπορεί να εκφράζεται ως απόλυτος αριθμός των περιπτώσεων ανά έτος ή ως ποσοστό ανά 100.000 άτομα ανά έτος όπως παραπάνω.

Τα στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι ο καρκίνος του μαστού είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου ενώ μετά τον καρκίνου του παχέως εντέρου ακολουθεί ο καρκίνος του προστάτη. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται λόγω μαστογραφικής εξέτασης και γηραιού πληθυσμού, ορμονικής υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση, διατροφή δυτικού τύπου, παχυσαρκία, κατανάλωση αλκοόλ και καπνού. Υπάρχει μια απότομη ηλικιακή κλίση, με περίπου το ένα τέταρτο των καρκίνων του μαστού να συμβαίνουν πριν από την ηλικία των 50 ετών και < 5% πριν από την ηλικία 35. Στις περισσότερες δυτικές χώρες, το ποσοστό θνησιμότητας έχει μειωθεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στις νεότερες ηλικίες λόγω βελτιωμένης θεραπείας και έγκαιρης ανίχνευσης.

Ωστόσο, ο καρκίνος του μαστού εξακολουθεί να είναι η κύρια αιτία θάνατου από καρκίνο μεταξύ των γυναικών στην Ευρώπη (Aebi et al. 2011). Στην Ευρώπη το 2008, περίπου 328 000 άνδρες διαγνώστηκαν με καρκίνο του

προστάτη, η συχνότητα εμφάνισης έχει τριπλασιαστεί τα τελευταία 40 χρόνια. Για το ίδιο έτος, εκτιμήθηκαν 69 000 θάνατοι από καρκίνο του προστάτη γεγονός που απεικονίζει το παράδοξο της «υπερ διάγνωσης» και κατά συνέπεια της υπερ θεραπείας. Έγκαιρη διάγνωση μετά από τη δοκιμή του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA), και η ευαισθησία του καρκίνων του προστάτη στις συστηματικές θεραπείες τον καθιστούν μια ασθένεια με υψηλό επιπολασμό (Horwich et al. 2013).



Εικόνα 1.8 Εκτιμώμενος επιπολασμός καρκίνου στην τριετία για την Ελλάδα, 2012.

Επιπολασμός είναι ο αριθμός ή το ποσοστό του πληθυσμού με μια καθορισμένη κατάσταση σε μια δεδομένη χρονική στιγμή ή κατά τη διάρκεια μιας καθορισμένης χρονικής περιόδου.

1/3/5-έτη επιπολασμός του καρκίνου όπως αναφέρεται στην ιστοσελίδα EUCAN είναι ο αριθμός των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο και είναι ακόμα ζωντανοί ένα / τρία / πέντε έτη μετά τη διάγνωση σε δεδομένο πληθυσμό. Για παράδειγμα, 3-ετής επιπολασμός το 2012 περιλαμβάνει όλες τις περιπτώσεις που διαγνώστηκαν τα 3 προηγούμενα χρόνια και είναι ακόμα ζωντανοί το 2012. Όπως φαίνεται από το σχήμα παρόλο που ο καρκίνος του μαστού έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης φαίνεται ότι έχει καλύτερη πρόγνωση και προσδόκιμο ζωής σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη καρκίνου,

όπως και ο καρκίνος του προστάτη που είναι τρίτος σε ποσοστό συχνότητας εμφάνισης αλλά δεύτερος σε ποσοστό επιβίωσης στην τριετία.

3.γ Η καρκινοπροστατευτική δράση των Γλυκοσινολικών

Τα σταυρανθή λαχανικά είναι τα μόνα που περιέχουν γλυκοσινολικά σε αναλογία περίπου 20 $\mu\text{mol/g}$ ξερής μάζας λαχανικών και πιστεύεται ότι σ' αυτές τις φυτοχημικές ενώσεις, οφείλεται η χημειοπροστατευτική δράση κατά του καρκίνου. Τα γλυκοσινολικά λαμβάνονται από τον άνθρωπο με την κατανάλωση διαιτολογίου που περιέχει σημαντικές ποσότητες σταυρανθών λαχανικών. Λαμβάνοντας υπόψη το ποικίλο φάσμα των χημικών ουσιών που παράγονται από το σύστημα γλυκοσινολικών- μυροσινάσης φαίνεται λογικό το γεγονός ότι μια σειρά χημειοπροστατευτικών μηχανισμών σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, οφείλονται στις αντικαρκινικές ιδιότητες των σταυρανθών λαχανικών. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται α. η επαγωγή των αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης της Nrf2 (NF-E2 με συντελεστή συσχέτισης 2) και AhR (aryl υδροκαρβονικών υποδοχέων), β. αναστολή των προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων από την καταστολή του NF- κ B (νουκλεοτιδικός παράγοντας- κ B), γ. αναστολή του κυτοχρώματος P450 (CYP) ενζυμική δραστηριότητα, δ. αναστολή της αποακετυλίωσης των ιστονών και διέγερση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (Zornig et al. 2001). Υπάρχει μια δόση-εξάρτησης σε αυτές τις ανταποκρίσεις: γενικά, η επαγωγή των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και η αναστολή της δραστηριότητας του κυτοχρώματος P450 (CYP) εμφανίζεται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις των φυτοχημικών στον οργανισμό, ενώ η ενεργοποίηση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των φυτοχημικών ενώσεων στον οργανισμό (Bonnesen et al 2001 and Hayes et al. 2008).

4. ΛΙΠΑΝΣΗ

4.α Γενικά

Τα φυτά απορροφούν τα διάφορα θρεπτικά στοιχεία είτε από τον αέρα (C, O), είτε από το έδαφος σε ανόργανες ιονικές μορφές διαλυμένες στην υγρασία του εδάφους. Η ατμόσφαιρα της γης εξασφαλίζει το αναγκαίο CO₂ για την επιτέλεση της φωτοσύνθεσης και το O₂ για τη λειτουργία της αναπνοής. Ακόμη, το νερό απορροφάται από το έδαφος και εφοδιάζει τη σύσταση του φυτού με O και H.

Για τα περισσότερα φυτά το άζωτο (N) απορροφάται από το έδαφος ως νιτρικό ή αμμωνιακό. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία (P, K, Ca, Mg, S) καθώς και τα μικροστοιχεία (μικροθρεπτικά) το φυτό τα παραλαμβάνει από το έδαφος. Τα προσλαμβανόμενα θρεπτικά στοιχεία, χρησιμοποιούνται από το φυτό είτε σαν δομικά υλικά των ιστών του, είτε ως παράγοντες που ρυθμίζουν τη θρέψη του (K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺).

4.β Η σημασία του Αζώτου (N) και Θείου (S) στην ανάπτυξη του φυτού

Το άζωτο είναι το απαραίτητο στοιχείο για την δόμηση των πρωτεϊνών. Στη φύση καταλαμβάνει τα 4/5 της ατμόσφαιρας και συναντάται σε κάθε κυτταρική σύσταση. Τα φυτά, ως αυτότροφοι οργανισμοί, μετατρέπουν το ανόργανο άζωτο (νιτρικό και αμμωνιακό) σε οργανικό (αμινοξέα, πρωτεΐνες). Το άζωτο, είναι πρωταρχικός παράγοντας αύξησης της απόδοσης μιας καλλιέργειας. Με εξαίρεση τα ψυχανθή, οι περισσότερες καλλιέργειες έχουν ανάγκη ενίσχυσης της περιεκτικότητας του εδάφους σε N.

Το θείο (S) μετέχει στη σύνθεση πολλών πρωτεϊνών (μεθειονίνη, κυστίνη) και οι ανάγκες των φυτών σε N και S χρονικά συμπίπτουν. Κατά μέσο όρο το 50% του εδαφικού θείου σε μεγάλο εύρος κατηγοριών εδαφών, συναντάται στην οργανική του μορφή. Τα φυτά προσλαμβάνουν το θείο με μορφή θειικής ρίζας (SO₄²⁻) κι' αυτό ευνοείται από την αλκαλικότητα του εδάφους.

Τα γλυκοσινολικά οξέα, ως πρωτεϊνικά παράγωγα των φυτών επηρεάζονται άμεσα από τη διαθεσιμότητα η μη σε αζωτούχες ενώσεις και θείο, καθώς περιέχουν σημαντικές ποσότητες αζώτου και θείου στο μορίο τους. Ακόμη, για τη σύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων πρόδρομα μόρια είναι πρωτεΐνες όπως η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη και η κυστεΐνη.

4.γ Επίδραση της λίπανσης N και S στη σύσταση ΓΚΣ των φυτών

Η περιεκτικότητα ενός φυτού σε γλυκοσινολικά εξαρτάται όχι μόνο από την παροχή θείου, αλλά επίσης και από το επίπεδο του αζώτου στο φυτό. Καθώς η αναλογία αζώτου προς θείο αυξάνει, η περιεκτικότητα σε γλυκοσινολικά μειώνεται (Hugentobler and Renwick, 1995; Kim et al., 2002). Η παροχή θείου κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας μπορεί να διαφοροποιήσει τη συσσώρευση συγκεκριμένων γλυκοσινολικών. Στο φυτό *Brassica napus* η χορήγηση θείου σε φυτά με έλλειψη προκάλεσε την αύξηση της αναλογίας αλειφατικών προς ινδολικά γλυκοσινολικά (Withers and O'Donnell, 1994; Zhao et al., 1994). Σε άλλη έρευνα παρατηρήθηκε ότι το επίπεδο αζώτου, όχι μόνο επηρέασε σημαντικά τη βιομάζα του κινέζικου λάχανου, αλλά επηρέασε σημαντικά το περιεχόμενο των γλυκοσινολικών. Παρά το γεγονός ότι το συμβατικό επίπεδο N μπορούσε να παράσχει αρκετά θρεπτικά συστατικά στο κινέζικο λάχανο για να ληφθεί προϊόν υψηλής βιομάζας, σχετικά υψηλότερο επίπεδο N αναμένεται να αυξήσει το περιεχόμενο των αντικαρκινικών γλυκοσινολικών (Gui-xiao et al 2009) . Επομένως, η διαμόρφωση στη λίπανση με θείο και άζωτο δίνει τη δυνατότητα σε πολλές καλλιέργειες, για τη βιοσύνθεση περισσότερων γλυκοσινολικών από ό, τι θα συνέβαινε συνήθως κάτω από τυπικές συνθήκες γεωργικής καλλιέργειας και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων στις καλλιέργειες των κραμβοειδών.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να αξιοποιήσει φυτικά δείγματα του είδους *Eruca Sativa* – κοινή ονομασία ρόκα, η οποία καλλιεργήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, ως προς την δραστικότητα των εκχυλισμάτων και τον περιεχόμενων σε αυτά γλυκοσινολικών οξέων σε καρκινικές σειρές. Συγκεκριμένα, το φυτό καλλιεργήθηκε με τέσσερις τρόπους α. σε πλήρης συνθήκες θρέψης, β. σε συνθήκες έλλειψης Αζώτου (N), γ. σε συνθήκες έλλειψης Θείου (S) και δ. σε συνθήκες έλλειψης Αζώτου και Θείου (N,S). Στο παρόν αναφέρεται η μελέτη ως προς τη σύσταση και την περιεκτικότητα των γλυκοσινολικών οξέων σε εκχυλίσματα από ρίζα και φύλλα ρόκας και την επίδραση αυτών σε καρκινικές σειρές HeLa.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Φυτικός ιστός

Ο φυτικός ιστός προήλθε από τις ρίζες και τα φύλλα του φυτού *Eruca sativa* το οποίο είχε καλλιεργηθεί με τέσσερις (4) διαφορετικούς τρόπους λίπανσης για τους σκοπούς της μελέτης. Η καλλιέργεια του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής (Κατσαρού Δήμητρα) και συνοψίζεται ως εξής:

Στην καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ρόκας (*Eruca sativa*) και υπόστρωμα αδρανούς άμμου (ποταμίσις) στην οποία είχε πραγματοποιηθεί χημική ανάλυση ως προς την περιεκτικότητα της σε θείο και άζωτο και η οποία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση σε πειράματα θρέψης. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε ψυχρό θερμοκήπιο, συνολικής έκτασης 700m² στον Πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι, Κύπρος. Η μέση ημερήσια θερμοκρασία ήταν 23.2°C, 21.7°C και 20.4°C για τους μήνες Νοέμβριο, Δεκέμβριο και Ιανουάριο αντίστοιχα. Σε κάθε γλάστρα εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα μακροστοιχεία: Mg(NO) 1.27g, Mg(NO) 1.08g και CaH(PO) 2.45g.

Συνολικά εφαρμόστηκαν 3 διαφορετικά επίπεδα αζώτου. Πιο αναλυτικά η αζωτούχος λίπανση εφαρμόσθηκε με τη μορφή νιτρικής αμμωνίας σε δόσεις ίσες με 0.32g, 3.01g και 7.71g ανά φυτοδοχείο. Οι δόσεις αυτές μαζί με την ποσότητα αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά με τη μορφή νιτρικού μαγνησίου, αντιστοιχούσαν σε δόσεις ίσες με 50, 250 και 600kg N ανά εκτάριο (ha). Το θείο χορηγήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές δόσεις ίσες με 10, 30, 70 και 150kg/ha με τη μορφή θειικού καλίου, ενώ προστέθηκαν σε κάθε φυτοδοχείο ποσότητες λιπάσματος ίσες με 0.19g, 0.69g, 1.70g και 4.18g ανά φυτοδοχείο. Η ποσότητα καλίου εξισορροπήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις με την προσθήκη στα φυτοδοχεία αντίστοιχης ποσότητας χλωριούχου καλίου.

Η δειγματοληψία του φυτικού ιστού έγινε στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, στην περίοδο της φυσιολογικής ωρίμανσης των βρώσιμων τμημάτων. Πιο αναλυτικά από κάθε μεταχείριση, συλλέγονταν ολόκληρα τα φυτά και τυχαία απομακρύνονταν 15 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (ίδιου μεγέθους) και από τα δύο είδη, χωρίς προσβολές και μηχανικούς

τραυματισμούς. Τα φύλλα τοποθετούνταν αμέσως σε σακουλάκια και ακολουθώντας σε δοχεία πολυστερίνης με ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο όλοι οι φυτικοί ιστοί λειοτριβήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου, λειοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους (Omirou et al, 2009).

2. Υλικά μεταχείρισης καρκινικών σειρών.

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, πρόκειται για ένα ευρείας χρήσης καλλιεργητικό μέσο, κατάλληλο κυρίως για την καλλιέργεια κυττάρων προερχόμενα από θηλαστικά. Ενδεικτικά περιέχει αμινοξέα, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, δεξτρόζη (D-γλυκόζη) και πυροσταφιλικό οξύ. Περισσότερες διευκρινήσεις μπορούν να αναζητηθούν στην εταιρεία Gibco αριθμός καταλόγου 41996-052

FBS- Fetal Bovine Serum, βόειος εμβρυϊκός ορός, είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα για τις *in vitro* κυτταρικές καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο ότι έχει πολύ χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων, τα οποία περιέχουν περισσότερους αυξητικούς παράγοντες, επιτρέποντας ευελιξία σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές κυτταρικής καλλιέργειας. Το προϊόν που χρησιμοποιήσαμε προέρχεται από την εταιρεία Gibco αριθμός καταλόγου 10270-106. Ο ορός φυλάσσεται στους -5 με -30°C και κατά την απόψυξή του συνήθως παρατηρείται κάποια καθίζηση, για το λόγο αυτό, ο ορός διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες και αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-20°C).

DMSO- Dimethylsulfoxide, χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό, προστίθεται σε κυτταρικά μέσα για τη μείωση σχηματισμού κρυστάλλων στις κυτταρικές δομές και έτσι αποτρέπει το θάνατο των κυττάρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης. Το ποσοστό διμεθυλοσουλφοξειδίου στο υλικό παγώματος είναι 10%. Περισσότερες πληροφορίες για το προϊόν μπορούν να αναζητηθούν στην εταιρεία Sigma Aldrich αριθμός καταλόγου D2650.

Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη τα αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιιεργειών λόγω της

αποτελεσματικής συνδυασμένης δράση τους έναντι των gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων. Το διάλυμα περιέχει 10.000 μονάδες / ml πενικιλίνης και 10000 µg / mL στρεπτομυκίνης. Στο πείραμα η συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι 100 μονάδες/ ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης. Περισσότερες πληροφορίες για το προϊόν μπορούν να αναζητηθούν στην εταιρεία Gibco αριθμός καταλόγου 15140-122.

Διάλυμα τρυψίνης 0.5% (10X) σε EDTA Το διάλυμα τρυψίνης χρησιμοποιείται για την διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών και την αποκόλληση τους από τον πάτο της φλάσκας καλλιέργειας. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1X αφού έγινε αραίωση με PBS. Το διάλυμα τρυψίνης αποτελείται από 5.0 g/L τρυψίνη (1:250), 2g/L EDTA (4g/L Na και 8.5g/L NaCl 10X). Περισσότερες πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν στην εταιρεία Gibco αριθμός καταλόγου 15400-054).

3. Εκχύλιση Δευτερογενών Μεταβολιτών

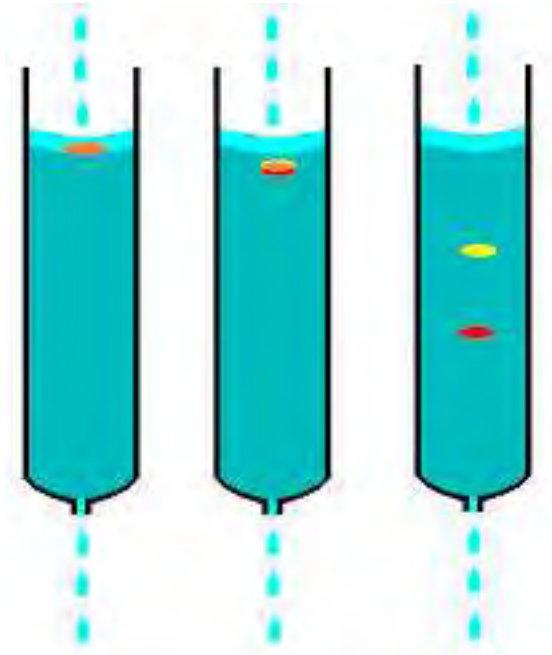
Η εκχύλιση των γλυκοσινολικών οξέων από τις ρίζες και τα φύλλα των φυτικών δειγμάτων έγινε με οργανικό διαλύτη (μεθανόλη 70%) και για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού ψευδαργύρου (Zn4O) 1M (10 µL /0.5 mL δείγματος). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν γουδί και γουδοχέρι, φυγόκεντρος και λουτρό για την θέρμανση της μεθανόλης.

Πρωτόκολλο εκχύλισης γλυκοσινολικών οξέων

1. Θρυμματισμός των φυτικών ιστών και τοποθέτηση τους σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.
2. Αποξήρανση των δειγμάτων με χρήση φυγοκεντρικού συμπυκνωτή υπό συνθήκες 5.1 Torr, T 45° C και χρόνο 24 ώρες.
3. Προσθήκη ζεστής μεθανόλης 70% σε κάθε δείγμα με αναλογία (1:2)
4. Φυγοκέντριση στις 10.000 rpm για 5 λεπτά και λήψη του υπερκείμενου.
5. Επανάληψη των βημάτων 3 και 4 και συνένωση των υπερκειμένων όγκων για κάθε μεταχείριση.

Συμπύκνωση και διαχωρισμός των δειγμάτων

1. Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 10.000 rpm για 10 λεπτά.
2. Λήψη του υπερκείμενου και απομάκρυνση ιζημάτων.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον φυγοκεντρικό συμπυκνωτή με πίεση 5.1 Torr και T 45° C έως ότου ο όγκος κάθε δείγματος να φτάσει στο 20-30% του αρχικού.
4. Απομάκρυνση πρωτεϊνών με προσθήκη ZnO (οξικού ψευδαργύρου) 1M στα δείγματα και αποθήκευση στους 4° C για 2-3 ώρες.
5. Φυγοκέντριση και κατακρήμνιση των πρωτεϊνών στις 10.000 rpm για 10 λεπτά.
6. Συλλογή του υπερκείμενου.
7. Ετοιμάζουμε στήλη χρωματογραφίας DEAE-Sephadex A25 με ρυθμιστικό διάλυμα 2M CH₃COONa-CH₃COOH pH 5.6 (από την προηγούμενη ημέρα έχουμε ζυγίσει 10g σε 100mL Buffer και το αφήνουμε να βράσει για μισή ώρα).
8. Μεταφέρουμε το εναιώρημα σε άδεια στήλη shepadex των 10 cm.
9. Φορτώνουμε το δείγμα που συλλέξαμε στο βήμα 6 (όγκος 0.5 mL) και κάνουμε διαδοχικά πλυσίματα τα οποία και παραλαμβάνουμε ως εξής:
 - Δις σε απεσταγμένο νερό 100 mL
 - Μεθανόλη 25 mL
 - 0.1 M KNO₃, 50 mL
 - 0.1 M K₂SO₄, 100 mL
10. Ξέπλυμα της στήλης με Buffer , η στήλη μπορεί να πεταχτεί στα απορρίμματα.



Εικόνα 3.1 Στήλη χρωματογραφίας

Παρακάτω παρατίθεται η αρχική ποσότητα του δείγματος για κάθε μεταχείριση και η τελική συγκέντρωση στο εκχύλισμα.

Μεταχείριση	Αρχική ποσότητα (mg)	Ποσότητα μετά την αποξήρανση (mg)	Τελικός όγκος (mL)	Συγκέντρωση (mg/mL)
N+/S+ Φύλλα	21400	2400	2.5	960
N+/S+ Ρίζες	10000	1200	1.2	1000
N-/S+ Φύλλα	2400	500	1.5	333
N-/S+ Ρίζες	2300	300	1.4	214
N+/S- Φύλλα	8300	1100	2.9	379
N+/S- Ρίζες	1400	100	0.6	166
N-/S- Ρίζες	1800	400	0.65	615

Πίνακας 3.1 Ποσοτική παράθεση των δειγμάτων κατά τη διαδικασία εκχύλισης των δευτερογενών μεταβολιτών.

4. Καρκινική σειρά HeLa

Η σειρά κυττάρων προήλθε από τα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας που πάρθηκαν από την Henrietta Lacks, η οποία πέθανε από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας το 1951. Τα κύτταρα διαδόθηκαν χωρίς τη γνώση ή την άδεια της Lack's από τον George Gey Otto. Αρχικά, η σειρά των κυττάρων ειπώθηκε ότι πήρε το όνομα της από την "Helen Lane" ή "Helen Larson", προκειμένου να διατηρηθεί η ανωνυμία της Lack's.

Τα κύτταρα διαιρούνται απεριόριστες φορές για όσο διάστημα πληρούνται οι βασικές συνθήκες επιβίωσης των κυττάρων (δηλαδή να διατηρούνται και να παραμένουν στο κατάλληλο περιβάλλον). Υπάρχουν πολλά στελέχη των κυττάρων HeLa αφού συνεχίζουν να εξελίσσονται καθώς αναπτύσσονται σε κυτταρικές καλλιέργειες, αλλά όλα τα κύτταρα HeLa προέρχονται από τα ίδια κύτταρα του όγκου που είχε αφαιρεθεί από την κα Lacks. Εκτιμάται ότι η συνολική μάζα των κυττάρων HeLa σήμερα υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη του υπόλοιπου σώματος της Henrietta Lacks.

Φύλαξη των κυττάρων

- Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C και 5% CO₂.
- Τα κύτταρα διατηρούνται σε φλάσκες κυτταρο καλλιέργειας: επιφάνεια 75 cm², όγκος ~10 mL

4.α Πρωτόκολλο εργασίας με κύτταρα HeLa

Διαχωρισμός των κυττάρων HeLa

Προετοιμασία

Φέρνουμε όλα τα θρεπτικά μέσα, το PBS και την τρυψίνη σε θερμοκρασία δωματίου.

Προετοιμάζουμε τις νέες φλάσκες και τα αναλώσιμα που θα χρειαστούμε (πιπέτες, πιπεταδόρος, προετοιμάζουμε την καμπίνα βιοασφάλειας που θα εργαστούμε).

1. Απορροφούμε το μέσο καλλιέργειας από τη φλάσκα.
2. Ξεπλένουμε τα κύτταρα με 5 mL PBS.

3. Απορροφούμε το PBS.
4. Προσθέτουμε 2 mL Τρυψίνης /EDTA. Η ποσότητα αυτή αρκεί για να καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας.
5. Επιστρέφουμε τα κύτταρα στον επωαστικό θάλαμο για 2 λεπτά
6. Προσθέτουμε 8 mL από το μέσο καλλιέργειας στη φλάσκα. Το FBS απενεργοποιεί την τρυψίνη.
7. Με χρήση πιπέτας εγχέουμε το μέσο πάνω και κάτω, και γύρω από την επιφάνεια της φλάσκας για να απομακρύνουμε τυχόν προσκολλημένα κύτταρα από την επιφάνεια της.
8. Μεταφέρουμε τα 10 mL των κυττάρων σε φιάλη Falcon 15 mL κωνικού σχήματος.
9. Μεταφέρουμε τον επιθυμητό όγκο κυττάρων στη νέα φλάσκα.
10. Διασπείρουμε ομοιόμορφα τα κύτταρα στο εσωτερικό της φλάσκας κουνώντας την απαλά μπρός-πίσω.

Τυπικές Διαιρέσεις που πραγματοποιήθηκαν :

- 1:5 Διάλυση των κυττάρων σε φλάσκα 10 cm: βάζουμε 10 mL από τα κύτταρα σε φλάσκα που περιέχει 8 mL καλλιεργητικό μέσο.
- 1:10 Διάλυση των κυττάρων σε φλάσκα 10 cm: βάζουμε 1mL από τα κύτταρα σε φλάσκα που περιέχει 9 mL από το καλλιεργητικό μέσο.

4.β Πάγωμα κυττάρων HeLa για μακροπρόθεσμη αποθήκευση

Το πρωτόκολλο αυτό είναι για την προετοιμασία αποθεμάτων κατεψυγμένων κυττάρων από φλάσκα επιφάνειας 10 cm.

* Ένα φιαλίδιο κατεψυγμένων κυττάρων HeLa (από ένα πρώιμο πέρασμα είναι καλό για ~ 50 περάσματα).

Προετοιμασία πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου

Προετοιμασία και αποστειρωμένο φιλτράρισμα των μέσων παγώματος: 10% DMSO, 20% FBS σε DMEM μέσο καλλιέργειας (1 mL/ σωλήνα). Για 10mL

μέσου παγώματος απαιτούνται DMSO 1mL , FBS 2 mL, DMEM 7 mL. Φέρνουμε το μέσο καλλιέργειας το PBS και την τρυψίνη σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Απορροφούμε το μέσο καλλιέργειας από τη φλάσκα
2. Ξεπλένουμε τα κύτταρα με 5 mL PBS
3. Απορροφούμε το PBS από τη φλάσκα
4. Προσθέτουμε 2 mL τρυψίνη/ EDTA.
5. Επιστρέφουμε τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 5 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 8 mL από το μέσο καλλιέργειας στη φλάσκα. Το FBS απενεργοποιεί την τρυψίνη.
7. Με χρήση πιπέτας εγχέουμε το μέσο πάνω και κάτω, και γύρω από την επιφάνεια της φλάσκας για να απομακρύνουμε τυχόν προσκολλημένα κύτταρα από την επιφάνεια της.
8. Μεταφέρουμε τα 10 mL των κυττάρων σε φιάλη Falcon 15 mL κωνικού σχήματος
9. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε φυγόκεντρο (2-3 λεπτά στις 500rpm)
10. Προσεκτικά λαμβάνουμε το υπερκείμενο
11. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 1 mL μέσο παγώματος και μεταφέρουμε σε αποθηκευτικό σωλήνα στους -80° C κατάψυξη. Ιδανικά, θέλουμε ~ 1 εκατομμύριο κύτταρα/κρυο-προστατευτικό σωλήνα. Όταν αποψυχθούν, το ποσό αυτό των κυττάρων οδηγεί σε επαρκή πυκνότητα για την υγιή κυτταρική ανάπτυξη, επιτρέποντας στα κύτταρα να αυξηθούν για περίπου 1 ημέρα πριν από το πέρασμα. Ένα εκατομμύριο κύτταρα αντιστοιχεί σε συσσώρευση ~ 60% σε μια φλάσκα 10 mL.

4.γ Απόψυξη αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων HeLa

Αυτό το πρωτόκολλο είναι για την απόψυξη αποθέματος κατεψυγμένων κυττάρων HeLa και τη μεταφορά των αποψυγμένων κυττάρων σε φλάσκα 10 cm. Η διαδικασία που περιγράφεται καλό είναι να γίνεται σε όσο πιο σύντομο διάστημα είναι δυνατό.

Προετοιμασία πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου.

Προθερμαίνουμε 20 mL κυττάρων στους 37° C και μεταφέρουμε 10mL κυττάρων σε 2 Falkon των 15 mL.

1. Αποψύχουμε τα κύτταρα σε ένα λουτρό στους 37° C. Ελέγχουμε ότι το καπάκι είναι σφιχτά κλειστό και ότι ο σωλήνας παραμένει σε όρθια θέση στο λουτρό για την αποφυγή μόλυνσεως. Μπορεί να χρειαστεί να σκουπίσουμε προσεκτικά τις πλευρές του σωλήνα με αιθανόλη 70% για την αποφυγή μόλυνσεως.
2. Μεταφέρουμε το 1 mL κυττάρων σε 10 mL θρεπτικού μέσου. Αυτό αραιώνει το DMSO
3. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα σε φυγόκεντρο (2-3 λεπτά στις 500 rpm).
4. Παίρνουμε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 mL μέσο καλλιέργειας.
5. Τοποθετούμε την καλλιέργεια σε φλάσκα επιφάνειας 10 cm.

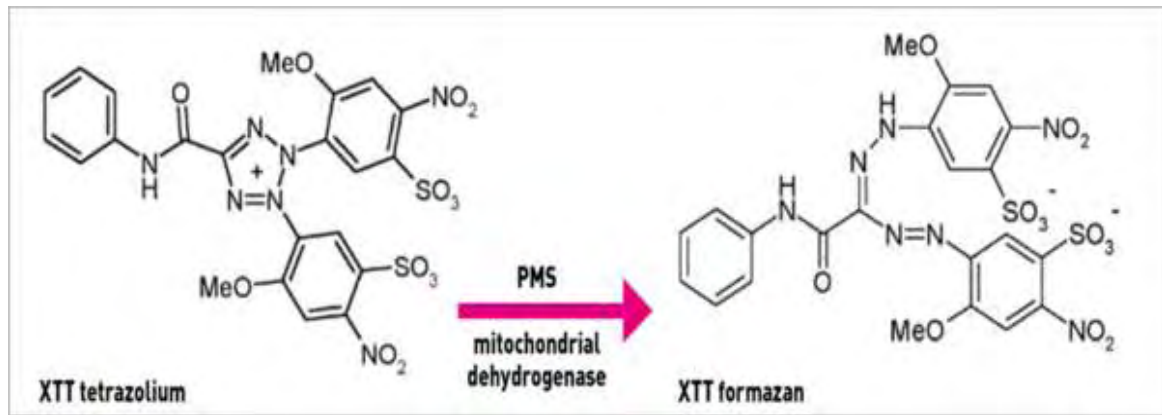
5. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ

5.α Γενικά για τη μέθοδο

Το Kit II (ΧΤΤ) κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι μια χρωματομετρική δοκιμή για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της βιωσιμότητας και κυτταροτοξικότητας. Το υλικό του δείγματος προέρχεται από κύτταρα που καλλιεργούνται σε μικροπλάκες 96-θέσεων.

Η ανάλυση βασίζεται στη διάσπαση του κιτρικού άλατος τετραζολίου ΧΤΤ παρουσία ενός αντιδραστήριου ζεύξης ηλεκτρονίων, παράγοντας ένα διαλυτό άλας φορμαζάνης. Η βιοχημική διαδικασία στηρίζεται στη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων, τα οποία αδρανοποιούνται λίγο μετά το θάνατο των κυττάρων. Αυτή η μέθοδος βρέθηκε να είναι πολύ αποτελεσματική για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον P.A Scudiero το 1988. Το πλεονέκτημα της χρήσης του ΧΤΤ είναι ότι ενώ κατά τη χρήση του ΜΤΤ παράγεται ένα συστατικό αδιάλυτης φορμαζάνης και απαιτείται διάλυση προκειμένου να μετρηθεί, η χρήση του ΧΤΤ παράγει μια διαλυτή χρωστική ουσία. Η χρήση του ΧΤΤ σε μεγάλο βαθμό απλοποιεί τη διαδικασία της μέτρησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και, ως εκ τούτου, είναι μια εξαιρετική λύση για το ποσοτικοποίηση των κυττάρων και τη βιωσιμότητά τους, χωρίς τη χρήση ραδιενεργών ισοτόπων.

Η διαδικασία δοκιμής περιλαμβάνει την καλλιέργεια των κυττάρων σε ένα πιάτο 96-θέσεων, προσθέτοντας το αντιδραστήριο ΧΤΤ και επωάζοντας για 2 – 24 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης (συνήθως μέσα σε 2-5 ώρες) σχηματίζεται ένα πορτοκαλί χρώμα, η ένταση του οποίου μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτόμετρο. Η ένταση της χρωστικής είναι ανάλογη προς τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων, δηλαδή όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών κύτταρων, τόσο μεγαλύτερη η δραστηριότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων, και τόσο υψηλότερη η συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας που σχηματίζεται. Η χρωστική ουσία που σχηματίζεται είναι διαλυτή στο νερό και η ένταση της μπορεί να διαβαστεί χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 4.1 Σχηματισμός φορμαζάνης

5.β Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας

Προετοιμασία πριν τη χρήση του ΧΤΤ

- Ξεπαγώνουμε το ΧΤΤ reagen και το αντιδραστήριο ενεργοποίησης στους 37° C αμέσως πριν τη χρήση τους.
 - Για την προετοιμασία του αντιδραστηρίου ΧΤΤ ικανής ποσότητας για ένα πιάτο 96 θέσεων απαιτείται 0.1 mL διαλύματος ενεργοποίησης σε 5 mL ΧΤΤ reagent.
1. Επίστρωση σε τρυβλίο 96 θέσεων των κυττάρων HeLa (15.000 κύτταρα/πηγαδάκι).
 2. Αφήνουμε το πιάτο για επώαση στον επωαστικό κλίβανο στου 37° C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂
 3. Μετά από 24 ώρες προσθέτουμε το προς εξέταση εκχύλισμα με συγκέντρωση 20mg/mL, κάθε πείραμα περιλαμβάνει:
 - δείγματα ελέγχου (control) τα οποία είναι η κυτταρική καλλιέργεια χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος και ορού Χ3 πηγαδάκια,
 - δείγμα θετικού ελέγχου κύτταρα που επωάζονται με προσθήκη ετοποσιδάσης – αντικαρκινικού φαρμάκου (100μM) οπότε και είναι ο δείκτης πλήρους θανάτωσης των κυττάρων

- δείγματα εξέτασης της απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα εξεταζόμενα μήκη κύματος τα οποία δεν περιέχουν παρά μόνο δείγμα του υπό εξέταση εκχυλίσματος.
4. Αφού περάσουν 48 ώρες προσθέτουμε το αντιδραστήριο ΧΤΤ 50μL / πηγαδάκι.
 5. Επώαση της καλλιέργειας με το ΧΤΤ για 4 ώρες στους 37° C στο επωαστικό κλίβανο.
 6. Φωτομέτρηση στα 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm.

Η πειραματική διαδικασία διαρκεί τέσσερις (4) ημέρες στο σύνολο της, το πακέτο ΧΤΤ που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Roche “Cell Proliferation Kit II (αριθμός καταλόγου 11 465 015 001). Ακόμη η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader της εταιρείας BİOTEK με χρήση του λογισμικού Gen5.

6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.

Για να υπολογίσουμε την αναστολή της ανάπτυξης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη δράση των εκχυλισμάτων της ρόκας στην καρκινική σειρά HeLa θα πρέπει να υπολογιστούν οι ακόλουθοι παράμετροι με βάση τα αποτελέσματα της απορρόφησης στα 450 και 630 nm.

OD_{ελέγχου}: αποτελεί την τιμή απορρόφησης του δείγματος ελέγχου και υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm. Αναφέρεται στα πηγαδάκια με παρουσία μόνο κυττάρων.

OD_{δείγματος}: αποτελεί την τιμή απορρόφησης των υπο εξέταση δειγμάτων και υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm. Αναφέρεται στα πηγαδάκια που περιέχουν κύτταρα και τα υπο εξέταση δείγματα.

OD_{εκχυλίσματος}: αποτελεί την τιμή απορρόφησης του κάθε εκχυλίσματος και υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm. Αναφέρεται στα πηγαδάκια που περιέχουν μόνο τα υπο εξέταση εκχυλίσματα, χωρίς παρουσία κυττάρων.

Ο παρακάτω μαθηματικός τύπος μας δίνει το ποσοστό (%) αναστολής

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{\{O.D_{\text{ελέγχου}} - [O.D_{\text{δείγματος}} - O.D_{\text{εκχυλίσματος]}\}}{O.D_{\text{ελέγχου}}} * 100$$

Περαιτέρω τα αποτελέσματα του ποσοστού % αναστολής των υπο εξέταση δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη χρήση της μεθόδου Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα (Independent Student's Test). Η μέθοδος αυτή, αποτελεί μια στατιστική δοκιμή εξαγωγής συμπερασμάτων που προσδιορίζει εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων σε δύο ομάδες μη συνδεδεμένες μεταξύ τους.

Η μηδενική υπόθεση για την μέθοδο t-test είναι ότι ο πληθυσμός των μέσων κι από τις δύο μη σχετικές ομάδες είναι ίσες; $H_0: \mu_1 = \mu_2$ Στις περισσότερες περιπτώσεις, προσπαθούμε να δούμε αν μπορούμε να δείξουμε ότι μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση και να αποδεχθεί την

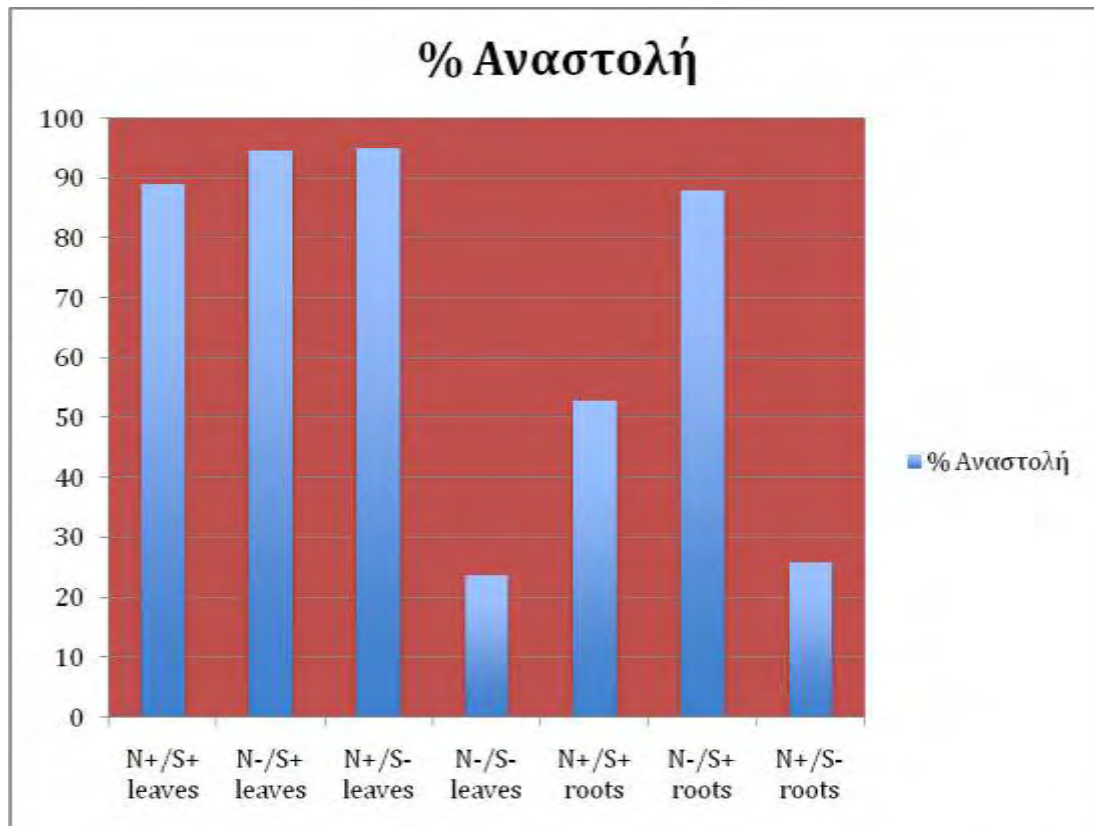
εναλλακτική υπόθεση, ότι δηλαδή τα μέσα του πληθυσμού δεν είναι ίσα: $H_A: \mu_1 \neq \mu_2$. Για να γίνει αυτό, πρέπει να ορίσουμε ένα επίπεδο σημαντικότητας που μας επιτρέπει να απορρίψουμε ή να δεχτούμε την εναλλακτική υπόθεση. Το επίπεδο σημαντικότητας στην παρούσα ανάλυση ορίστηκε ως 0,05.

Γ. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια της μελέτης φυτικών δειγμάτων προερχόμενα από φυτά ρόκας (*Eruca sativa*), τα οποία καλλιεργήθηκαν με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους λίπανσης. Οι διαφορετικές μεταχειρίσεις αφορούσαν την παροχή αζώτου και θείου σε διαφορετικά σχήματα χορήγησης τα οποία ήταν α. πλήρης λίπανση (N+/S+), β. πλήρης λίπανση αζώτου και μειωμένη λίπανση θείου (N+/S-) , γ. μειωμένη λίπανση αζώτου και πλήρης λίπανση θείου (N-/S+) και δ. Μειωμένη λίπανση σε άζωτο και θείο (N-/S-). Η μελέτη επικεντρώθηκε στα φύλλα και τις ρίζες του φυτού καθώς σ' αυτά τα μέρη του φυτού υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων. Ο λόγος μελέτης των διαφορετικών μεταχειρίσεων όσον αφορά την αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας έγινε γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι η διαφοροποίηση στη λίπανση της ρόκα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφορετικής κατηγορίας γλυκοσινολικών οξέων τα οποία μπορεί να έχουν και διαφορετική δράση όσον αφορά την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

1. Επίδραση των εκχυλισμάτων ρόκας στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων HeLa.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα ρόκας και γλυκοσινολικών οξέων επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων HeLa. Ακόμη, φαίνεται ότι παρεμβάσεις στη λίπανση του φυτού κατά την ανάπτυξη του, επηρεάζουν τη σύνθεση του σε γλυκοσινολικά οξέα και έχουν επιπτώσεις στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων HeLa από τη χορήγηση σε αυτά εκχυλισμάτων προερχόμενα από τα φύλλα του φυτού σε σχέση με τη χορήγηση σε αυτά εκχυλισμάτων από τις ρίζες του φυτού. Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα του φυτού έχουν 90-95% ποσοστό αναστολής. Μεταξύ των μεταχειρίσεων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταχείριση που είναι πλήρης σε θείο και ελλιπής σε άζωτο καθώς τα εκχυλίσματα από φύλλα και ρίζες εμφανίζουν υψηλά ποσοστά αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HeLa (88-94%) , ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.



Εικόνα 5.1 Γράφημα αναπαράστασης % αναστολής των εκχυλισμάτων ρόκας σε καρκινικές σειρές HeLa.

Συγκεκριμένα, η μεταχείριση με πλήρη λίπανση εμφανίζει υψηλό ποσοστό αναστολής στο εκχύλισμα φύλλων και λιγότερη δραστικότητα στο εκχύλισμα από τις ρίζες (53%). Η μεταχείριση που έχει επαρκές άζωτο και ελλιπές θείο εμφανίζει αρκετά μεγάλο ποσοστό αναστολής όσον αφορά το εκχύλισμα των φύλλων (>90%) και αρκετά χαμηλό ποσοστό αναστολής στο εκχύλισμα ρίζας (<30%). Τέλος η μεταχείριση με ελλιπές άζωτο και θείο φαίνεται ότι επηρεάζει πολύ αρνητικά την ανάπτυξη του φυτού καθώς δεν βοηθά στην ανάπτυξη ριζικού συστήματος, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει αρκετό δείγμα για εξέταση από την αρχή ακόμη του πειράματος. Επίσης η δραστικότητα του εκχυλίσματος φύλλων εμφανίζει το χαμηλότερο ποσοστό αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων HeLa (22 %).

Συμπεράσματα

Με την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται η εικασία της ανάπτυξης διαφορετικής κατηγορίας γλυκοσινολικών οξέων στο φυτό ρόκα έπειτα από εφαρμογή διαφορετικών σχημάτων λίπανσης κατά την καλλιέργεια του φυτού. Ακόμη, φαίνεται πως τα εκχυλίσματα φύλλων του φυτού είναι πιο πλούσια σε δραστικά γλυκοσινολικά οξέα σε σχέση με τα εκχυλίσματα ρίζας. Είναι βέβαια αναγκαίο η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων να δοκιμασθεί πέρα από τη σειρά HeLa και σε άλλες κατηγορίες καρκινικών κυττάρων για ευρύτερη επιβεβαίωση της δράσης τους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αλλά και προηγούμενων μελετών από την υπάρχουσα βιβλιογραφία συμπεραίνουμε ότι η ρόκα είναι ένα λαχανικό με μεγάλη διατροφική αξία και πιθανός ισχυρή καρκινοπροστατευτική δράση. Ακόμη, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον να γίνει ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων σε γλυκοσινολικά οξέα ώστε να γίνει γνωστό ποια κατηγορία γλυκοσινολικών οξέων εμφανίζει μεγαλύτερη δράση στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και να ενισχυθούν οι προσπάθειες εξέλιξης του φυτού.

Βιβλιογραφία

1. Aebi S., Davidson T., Gruber G. and Cardoso F. (2011) “Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice
2. Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up” *Annals of Oncology* 22 vi12–vi24
3. Baile L., H. (1949). *Bot. Rev.* 22: 81-66.
4. Barth C., and Jander G. (2006) “ Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense”. *Plant J.* 46:549–562.
5. Bidart-Bouzat M., G. and Kliebenstein D., J. (2008), “Differential Levels of Insect Herbivory in the Field Associated with Genotypic Variation in Glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*”. *J Chem. Ecol.* 34:1026–1037.
6. Bonnesen C, Eggleston I., M. and Hayes J., D. (2001) “Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines”. *Cancer Res* 61:6120–6130
7. Divakara E., V. Sastry (2003), “ Taramira (*Eruca sativa*) and its improvements – a review” *Agric. Rev.* Vol. 24. No.4. 2003.
8. Du L, Lykkesfeldt J, Olsen C., E. and Halkier B., A. (1995) “Involvement of cytochrome P450) in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an in vitro microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba*”. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12505–2509
9. Du L. and Halkier B., A. (1996) “Isolation of a microsomal enzyme system involved in glucosinolate biosynthesis from seedlings of *Tropaeolum majus* L.”. *Plant Pysiol* 111: 831–837
10. Giamoustaris A. and Mithen R., F. (1996) ‘Genetics of aliphatic glucosinolates IV. Side chain modifications in *Brassica oleracea*’. *Theor Appl Genet* 93: 1006–1010.

11. Gimsing A., L. and Kirkegaard J., A. (2009), "Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil". *Phytochem Rev.* 8:299–310.
12. Grabb C., D. and Abel S. (2006) "Glucosinolate metabolism and its control". *Trends in Plant Science* 11:89-100.
13. Griffiths D., W, Birch A., N., E, and Hillman J., R. (1998) "Antinutritional compounds in the Brassicaceae: Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects" *J Hort Sci and Biotech* 73: 1–18
14. Gulfraz M, Sadiq A, Tariq H, Imran M, Qureshi R, Zeenat A. (2011) „Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed“ *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1351-1359.
15. Halkier B., A. and Du L, (1997) "The biosynthesis of glucosinolates". *Trends in Plant Sci* 2: 425–431.
16. Halkier B., A. and Gershenzon, J. (2006) "Biology and biochemistry of Glucosinolates". *Annual Rev. Plant Biol.* 57:303–333.
17. Hayes J., D, Kelleher M., O, Eggleston I., M. (2008)" The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates" *Eur J Nutr* 47 (Suppl 2):73–88.
18. Hereman., S., I. (1868), *Plaxton's Botanical Dictionary*. Bradbury Evans and Co. London. pp 225.
19. Horwich A., Hugosson J., de Reijke T., Wiegel T., Fizazi K., Kataja V & Panel Members (2013) "Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012" *Annals of Oncology* 00: 1–22.
20. Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., and Gershenzon, J. (2001), "The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory". *Plant Cell* 13:2793–2807.
21. Leonardis, W. et al (1997), "Rocket: A Mediterranean Crop for the World". IPGRI, Rome Italy. pp 25-35.
22. Li, Q., Eigenbronde, S. D., Stringam, G. R., and Thiagarajah, M. R. (2000),

- “Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities”. *J. Chem. Ecol.* 26:2401–2419.
23. Mauricio R. (1998), “ Costs of resistance to natural enemies in field populations of the annual plant *Arabidopsis thaliana*” *Am. Nat.* 151:20–28.
 24. Mithen R., (2001) “Glucosinolates – biochemistry, genetics and biological activity” *Plant Growth Regulation* 34: 91–103
 25. Omirou M., D. (2009) “Effect of nitrate and sulfate fertilization on production of glykosinolates in the tissues of the rocket (*Eruca sativa*) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and effects of incorporation of residues of broccoli and glykosinolates on soil microbial communities» PhD Research, AUA, Dept. Natural Resources and Agricultural Engeneering.
 26. Parkin I, Magrath R, Keith D, Sharpe A, Mithen R., F, and Lydiate D. (1994) “ Genetics of aliphatic glucosinolates II. Hydroxylation of alkenyl glucosinolates in *Brassica napus*”. *Heredity* 72: 594–598 Prakash S. (1980), “*Brassica* Crops and Wild Allies”. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp162.
 27. Petersen B., L. et al. (2002), “Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*”. *Planta* 214: 562–571.
 28. Singh D. (1958), “Rapeseed and Mustard”. Indian Central Oilseeds Committee, New Delhi.
 29. Sonderby I., E, Geu-Flores F. and Halkier B., A. (2010) „Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond“ *Trends in Plant Science* Vol.15 No.5.
 30. Sturtevant E.L (1915), “New York Agriculture Experimental Station”. Twenty Seventh Annual Report 1915. New York.
 31. Tutin T., G. et al (1964). *Flora Europaeae*, Vol. 1 Cambridge University Press. pp 340.
 32. Zhang Z. Y., Ober, J. A., and Kliebenstein, D. J. (2006),” The gene controlling the quantitative trait locus epithiospecifier modifier1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*”. *Plant Cell* 18:1524–1536.

33. Zornig M, Anne-Odile Hueber A., O, Baum W, Evan G. (2001) "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis" *Biochimica et Biophysica Acta* 1551 F1-F37
34. Falk K. L., Tokuhisa J. G., Gershenzon J (2007) "The Effect of Sulfur Nutrition on Plant Glucosinolate Content: Physiology and Molecular Mechanisms" *Plant Biol.* 9 573 – 581
35. Hugentobler, U. and Renwick, J. A. A. (1995) "Effects of plant nutrition on the balance of insect relevant cardenolides and glucosinolates in *Erysimum cheiranthoides*". *Oecologia* 102, 95 – 101.
36. Kim, S.-J., Matsuo T., Watanabe, M., and Watanabe, Y. (2002) "Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.)". *Soil Science and Plant Nutrition* 48, 43 – 49.
37. Withers, P. J. A. and O'Donnell, F. M. (1994) "The response of doublelow winter oilseed rape to fertiliser sulphur". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 66, 93 – 101.
38. Zhao, F., Evans, E. J., Bilsborrow, P. E., and Syers, J. K. (1994) "Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L)". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64, 295 – 304.
39. Gui-xiao L., A., Ping, F., Yi-bo, T., Ya-juan, L., Xian-yong, L., (2009) "Effect of nitrogen level on growth and glucosinolates content of Chinese kale" *Acta Metallurgica Sinica*, 15(2) 429-434.

Websites

<http://www.cancer.gov/>