



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

**«Επίδραση εκχυλισμάτων ρόκας (*Eruca sativa*) στην ανάπτυξη
ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων»**



ΘΥΜΝΙΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**«Επίδραση εκχυλισμάτων ρόκας (*Eruca sativa*) στην ανάπτυξη
ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων»**

“Effect of *Eruca sativa* extracts on the growth of human cancer cells”

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτέρως θέλω να ευχαριστήσω την κα Καλλιόπη Λιαδάκη, που ήταν η επιβλέπουσα της εργασίας, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της διπλωματικής εργασίας όσο και για τη βοήθεια και τις συμβουλές της κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας αλλά και κατά τη συγγραφή της. Για μένα είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω και να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο, με το οποίο δεν είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ στο παρελθόν. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την κα Καλλιόπη Παπαδοπούλου αλλά και το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, τόσο για την παροχή των εκχυλισμάτων της ρόκας όσο και για τις γνώσεις και τις συμβουλές κατά τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο Κυτταροκαλλιιεργειών και στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που με βοήθησαν να εξοικειωθώ με το χώρο του εργαστηρίου και να μάθω να εργάζομαι σε αυτόν. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	7
----------	---

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ	8
1.1 Γενικά	8
1.2 Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης	9
1.3 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων	11
1.4 Χημειοπροφύλαξη	13
2. ΤΟ ΦΥΤΟ ΡΟΚΑ	17
3. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	19
3.1 Γλυκοσινολικά οξέα	21
3.2 Επίδραση της θεϊκής και της αζωτούχας λίπανσης στα γλυκοσινολικά οξέα	24
3.3 Βιολογικές δράσεις των γλυκοσινολικών οξέων στα φυτά και στον άνθρωπο	25
3.3.1 Αντικαρκινικές δράσεις γλυκοσινολικών οξέων	26
ΣΚΟΠΟΣ	30

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	31
2. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	32
2.1 Εκχύλιση γλυκοσινολικών οξέων	33
3. ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	35
3.1 Συντήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια	36
3.2 Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας	37
3.2.1 Πάγωμα κυττάρων	38
3.2.2 Ξεπάγωμα κυττάρων	38

4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ	39
5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΧΤΤ	41
5.1 Αρχή της μεθόδου	41
5.2 Πειραματική διαδικασία	42
6. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	45
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
1. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2	47
2. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων MCF7	51
3. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων HeLa	55
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοσινολικά οξέα αποτελούν μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, που απαντώνται κυρίως στην οικογένεια Brassicaceae και πρόκειται για ενώσεις που προέρχονται από αμινοξέα. Τα προϊόντα της υδρόλυσής τους εμφανίζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις, όπως άμυνα εναντίον εχθρών των φυτικών οργανισμών, αλλά και χημειοπροστασία στον άνθρωπο. Δύο από τα στοιχεία θρέψης των φυτών που επηρεάζουν τη σύσταση και τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών στα φυτά είναι το άζωτο και το θείο. Το φυτό *Eruca sativa* (ρόκα) προέρχεται από την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου και καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό.

Σε προηγούμενη μελέτη φυτά ρόκας αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές μεταχειρίσεις λίπανσης αζώτου και θείου, απομονώθηκαν εκχυλίσματα από φύλλα και ρίζες των φυτών και προσδιορίστηκε η σύσταση και η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα διαφορετικά εκχυλίσματα, καθώς και η επίδρασή τους στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός καθαρισμός των εκχυλισμάτων και διερευνήθηκε η επίδραση των διαφορετικών κλασμάτων στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), ήπατος (HepG2) και μαστού (MCF-7). Χρησιμοποιώντας τη βιοδοκιμή XTT, που βασίζεται στην δραστικότητα μιτοχονδριακών ενζύμων, βρέθηκε ότι τα διαφορετικά εκχυλίσματα προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικό βαθμό. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι ο χρωματογραφικός καθαρισμός των εκχυλισμάτων οδηγεί σε ικανοποιητικό βαθμό στον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα και ενισχύει την αντικαρκινική τους δράση.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος

1.1. Γενικά

Με τις μάστιγες της κακής διατροφής και των λοιμωδών ασθενειών κάτω από σχετικά καλό έλεγχο σε πολλά μέρη στον κόσμο, ο καρκίνος έχει αναδειχθεί σε μείζον πρόβλημα υγείας. Με τη συνεχή μείωση της θνησιμότητας από την καρδιακή νόσο, ο καρκίνος θα μπορούσε να αναδειχθεί σήμερα σε κύρια αιτία θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά στη συμπεριφορά τους και στην απόκριση των ασθενών στις θεραπείες. Παρά τις σημαντικές επιτυχίες στη θεραπεία λίγων συγκεκριμένων τύπων καρκίνου, οι θάνατοι από τον καρκίνο παραμένουν στο σύνολό τους σε απογοητευτικά υψηλά επίπεδα τα τελευταία 30 χρόνια. Φυσικά ο καρκίνος δεν είναι μια ασθένεια αλλά μια πλειάδα διαφορετικών νόσων που χαρακτηρίζονται από τη θέση, τον τύπο του ιστού και το βαθμό της κακοήθειας.

Η πλειονότητα των ανθρώπινων καρκίνων δεν μπορεί να εξηγηθεί χρησιμοποιώντας μονογονιδιακά πρότυπα κληρονομικότητας. Σε κυτταρικό επίπεδο ο καρκίνος είναι κατά βάση μια γενετική ασθένεια. Κάθε ανθρώπινο κύτταρο φέρει ένα πολύπλοκο και αυστηρά ρυθμιζόμενο γενετικό πρόγραμμα, που ελέγχει τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Ο καρκίνος οφείλεται σε μια διαταραχή αυτού του φυσιολογικού ρυθμιστικού προτύπου, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, γεγονότα που χαρακτηρίζουν ένα κακοήγη όγκο. Μέσω της τοπικής αύξησης και επέκτασής τους, καθώς και μέσω της μεταστατικής διασποράς τους σε απομακρυσμένα σημεία, οι καρκίνοι διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία των οργάνων προκαλώντας σοβαρή νοσηρότητα και συχνά θάνατο.

Η πλήρης ανάπτυξη ενός καρκίνου απαιτεί κατά κανόνα την άθροιση πολλαπλών διαδοχικών γενετικών μεταλλάξεων σε ένα συγκεκριμένο σωματικό κύτταρο. Αυτές οι μεταλλάξεις στα σωματικά κύτταρα περιορίζονται στον όγκο και δεν βρίσκονται στα φυσιολογικά κύτταρα του ατόμου. Σε αντίθεση, μία μετάλλαξη στα κύτταρα της γαμετικής σειράς βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του ατόμου και μπορεί να μεταδίδεται και στις επόμενες γενιές. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι κάποια γονίδια, που είναι μεταλλαγμένα σε όλα τα σωματικά κύτταρα, είναι επίσης μεταλλαγμένα και στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, με αποτέλεσμα την εμφάνιση

συγκεκριμένων συνδρόμων προδιάθεσης για καρκίνο, που μεταβιβάζονται με μενδελική κληρονομικότητα.

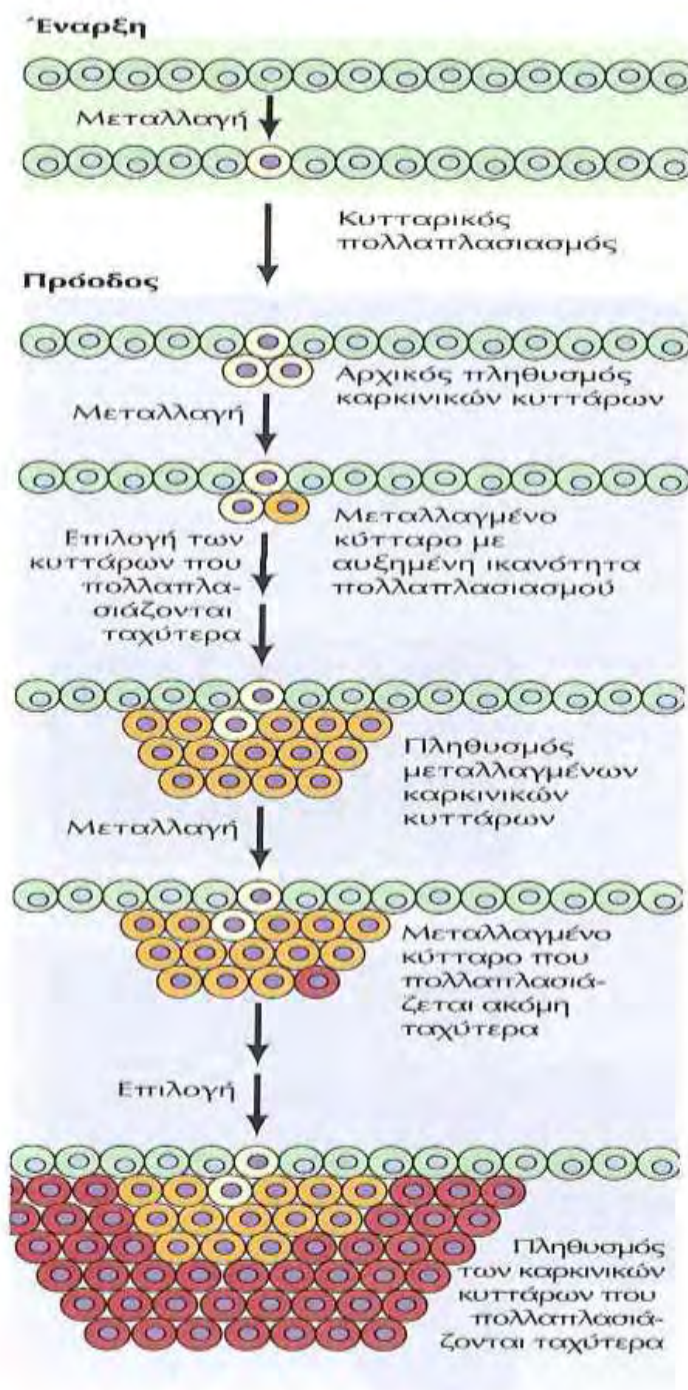
Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών οι ερευνητές που ασχολούνται με τον καρκίνο έχουν κάνει σημαντική πρόοδο στην ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, τα οποία όταν μεταλλαγούν μπορούν να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη ενός καρκινικού κυττάρου. Από αυτόν τον όγκο ερευνητικών αποτελεσμάτων αρχίζει να αναδύεται η γενική εικόνα της παθογένεσης του καρκίνου (*Gelehrter, Collins, Ginsburg, 2003; Hanahan et al., 2000*).

1.2. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

Ένα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του καρκίνου είναι ότι όλα τα κύτταρα ενός όγκου προέρχονται από ένα αρχικό κύτταρο που πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Με άλλα λόγια, τα κύτταρα ενός όγκου αποτελούν έναν κυτταρικό κλώνο. Ωστόσο, η σύσταση των όγκων από έναν κλώνο κυττάρων δεν σημαίνει ότι το αρχικό προγονικό κύτταρο από το οποίο προήλθε ένας όγκος απέκτησε εξαρχής όλα τα χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου. Αντίθετα, η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων, κατά την οποία τα κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε κακοήγη.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η ανάπτυξη του καρκίνου θεωρείται ότι είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων που βασίζεται στη μεταλλαγή και στην επιλογή των κυττάρων με σταδιακά αυξανόμενη ικανότητα πολλαπλασιασμού, επιβίωσης, διείσδυσης σε ιστούς και τελικά μετάστασης. Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας αυτής, η έναρξη της ογκογένεσης (*tumor initiation*), θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που οδηγούν στον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό ενός κυττάρου. Στη συνέχεια, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη ενός πληθυσμού ογκοκυττάρων που σχηματίζουν έναν κλώνο. Η πρόοδος της ογκογένεσης (*tumor progression*) συνεχίζεται καθώς συμβαίνουν επιπρόσθετες μεταλλαγές στα κύτταρα του κλώνου. Ορισμένες από αυτές τις μεταλλαγές δίνουν στο κύτταρο συγκριτικό πλεονέκτημα επιλογής, όπως πιο ραγδαίο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Συνεπώς, οι απόγονοι ενός κυττάρου που φέρει μια τέτοια μεταλλαγή κυριαρχούν μέσα στον πληθυσμό των κυττάρων του όγκου. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται επιλογή κλώνου, αφού ένας νέος κλώνος ογκοκυττάρων εξελίσσεται και επικρατεί επειδή έχει αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού ή άλλες ιδιότητες (όπως είναι η επιβίωση, η διείσδυση ή η μετάσταση) οι οποίες παρέχουν συγκριτικό πλεονέκτημα επιλογής. Η επιλογή κλώνου συνεχίζεται κατά την ανάπτυξη

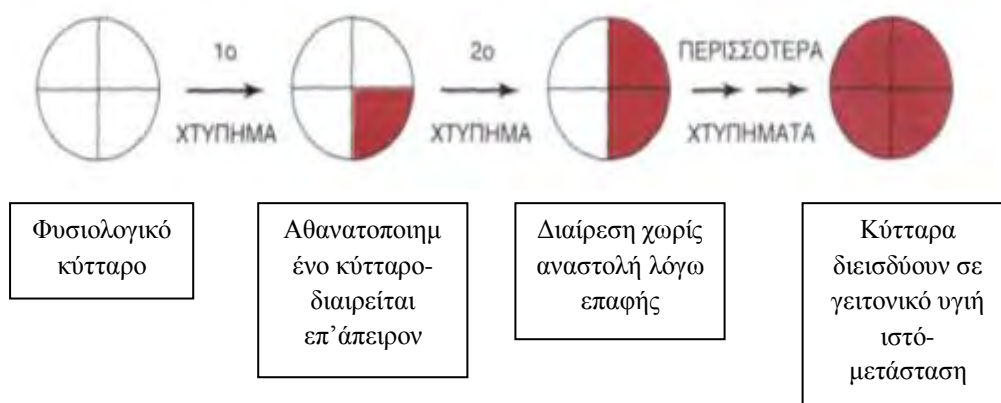
του όγκου, ώστε οι όγκοι συνεχίζουν να αναπτύσσονται πιο γρήγορα και γίνονται ολοένα πιο κακοήθεις (Εικόνα 1) (Cooper, Hausmann, 2011).



Εικόνα 1. Στάδια ανάπτυξης ενός όγκου (Από: *Το κύτταρο*, Cooper & Hausman, 2011).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για τη μετατροπή ενός κυττάρου από φυσιολογικό σε καρκινικό απαιτούνται περισσότερες από μία μεταλλάξεις. Το πολυσταδιακό μοντέλο

ως γενικό παράδειγμα για την προέλευση του καρκίνου παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Αρχικά παρουσιάζεται ένα φυσιολογικό κύτταρο, το οποίο διαθέτει τον αναγκαίο μηχανισμό να καταστέλλει την ανάπτυξή του όταν χρειάζεται. Μία μοναδική μετάλλαξη μπορεί να αυξήσει την ικανότητα αυτού του κυττάρου να πολλαπλασιαστεί, αλλά φαίνεται ανεπαρκής για να το ωθήσει να διαφύγει τελείως από τους μηχανισμούς φυσιολογικού ελέγχου. Υπάρχουν στην πραγματικότητα σημαντικοί λόγοι γι' αυτό. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 10^{14} κύτταρα στο σώμα και κατά τη διάρκεια της αντιγραφής ο ρυθμός μετάλλαξης υπολογίζεται σε 10^{-6} ανά γονίδιο, επομένως, ο καρκίνος θα ήταν ένα καθημερινό γεγονός αν ήταν αρκετή για την εμφάνισή του μία μόνο μετάλλαξη. Το μεμονωμένο μεταλλαγμένο κύτταρο μπορεί να έχει φυσιολογικό φαινότυπο ή μπορεί να διαθέτει ένα αυξητικό πλεονέκτημα που θα του επιτρέψει να επιβιώσει, να πολλαπλασιαστεί και τελικά να αποκτήσει μία ακόμη μετάλλαξη. Με τη μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο το κύτταρο αποκτά κάπως περισσότερη αυτονομία και συνεπώς είναι ικανό να διαιωνιστεί καλύτερα από τους γείτονές του. Τελικά φθάνει σε ένα σημείο όπου είναι ικανό να αναπτύσσεται παρόλα τα σήματα που φυσιολογικά θα σταματούσαν τον πολλαπλασιασμό του και στη συνέχεια μπορεί να συνεχίσει να καταστρέφει γειτονικούς ιστούς και να εξαπλώνεται προκαλώντας μεταστάσεις.



Εικόνα 2. Διάγραμμα της πολυσταδιακής προέλευσης του καρκίνου.

1.3. Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα εκδηλώνουν ανωμαλίες σε διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, που αφορούν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την

κυτταρική επιβίωση και αποκτούν χαρακτηριστικές ιδιότητες που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων συνοψίζονται παρακάτω.

- Έλλειψη απόκρισης σε σήματα που αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση. Όπως συμβαίνει με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vivo*, τα καρκινικά κύτταρα σε μια κυτταροκαλλιέργεια δεν αποκρίνονται σε σήματα που προκαλούν την καταστολή του πολλαπλασιασμού ή την εισαγωγή τους στη φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου, αλλά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.
- Αυτοκρινής διέγερση του πολλαπλασιασμού. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα παράγουν αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό τους. Όταν ένα κύτταρο παράγει τον αυξητικό παράγοντα στον οποίο αποκρίνεται το ίδιο, πυροδοτείται η συνεχής αυτοδιέγερση του πολλαπλασιασμού του, με αποτέλεσμα το καρκινικό κύτταρο να εξαρτάται λιγότερο από αυξητικούς παράγοντες που προέρχονται από φυσιολογικές πηγές. Σε άλλες περιπτώσεις, η μειωμένη εξάρτηση των ογκοκυττάρων από αυξητικούς παράγοντες προκύπτει από ανωμαλίες σε ενδοκυτταρικά συστήματα σηματοδότησης.
- Έλλειψη αναστολής του πολλαπλασιασμού λόγω επαφής κυττάρων. Η επαφή ενός φυσιολογικού κυττάρου με άλλα κύτταρα αναστέλλει τόσο την κίνησή του όσο και την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται. Αντιθέτως, τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να εξαπλώνονται και μετά την επαφή τους με γειτονικά κύτταρα και αναπτύσσονται πάνω από αυτά, δημιουργώντας ακανόνιστα πρότυπα πολλαπλών στιβάδων.
- Διείσδυση σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς. Τα κακοήθη κύτταρα εκκρίνουν πρωτεάσες που διασπούν τα συστατικά του εξωκυτταρικού στρώματος, επιτρέποντας τη διείσδυση σε γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς.
- Ενίσχυση αγγειογένεσης. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που επάγουν το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη προκειμένου ο όγκος να μπορέσει να αναπτυχθεί πέρα από ένα συγκεκριμένο μέγεθος (περίπου ενός εκατομμυρίου κυττάρων). Για την ανάπτυξη του όγκου πέρα από αυτό το μέγεθος είναι απαραίτητα νέα αιμοφόρα αγγεία, προκειμένου να προμηθεύσουν

με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα καρκινικά κύτταρα. Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων είναι σημαντικός για την ανάπτυξη του όγκου και για τη μετάσταση.

- Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού. Ένα γενικό χαρακτηριστικό των περισσότερων καρκινικών κυττάρων είναι ότι αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν με φυσιολογικό τρόπο. Η αποτυχία διαφοροποίησης σχετίζεται συχνά με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, καθώς τα περισσότερα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα παύουν να διαιρούνται. Τα καρκινικά κύτταρα είναι συνήθως εγκλωβισμένα σε κάποιο πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης και πολλαπλασιάζονται απεριόριστα.
- Μείωση απόπτωσης. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Η αποτυχία των καρκινικών κυττάρων να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) επηρεάζει σημαντικά τόσο την ανάπτυξη ενός όγκου, όσο και την επιβίωση και αύξηση των μεταστατικών κυττάρων σε απομακρυσμένες θέσεις. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα δεν οδηγούνται σε απόπτωση μετά τη δημιουργία βλαβών στο DNA, γεγονός που συμβάλλει στην ανθεκτικότητά τους στην ακτινοβολία και σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα που δρουν προκαλώντας βλάβες στο DNA. Παράλληλα με την αποφυγή της απόπτωσης, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής του γενετικού τους υλικού, καθώς εκφράζουν την τελομεράση, ένζυμο απαραίτητο για τη διατήρηση των άκρων των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (Cooper & Hausmann, 2011).

1.4. Χημειοπροφύλαξη

Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιήθηκε το 1976 από τον Michael Sporn για να περιγράψει την αναστολή ή την αναστροφή της καρκινογένεσης με τη χρήση μη κυτταροτοξικών θρεπτικών ουσιών ή φαρμακολογικών ενώσεων που προστατεύουν ενάντια στην ανάπτυξη των κακοηθών κυττάρων (Sporn, 2000, Tsao et al., 2004). Την ίδια περίπου εποχή (1977) επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι το 80% του συνόλου των καρκίνων οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (κάπνισμα, διατροφή, ακτινοβολία) (Parsa, 2012; Higginson et al., 1977; Doll et al., 1981). Τα τελευταία χρόνια αυξάνονται όλο και περισσότερο οι μελέτες που σχετίζονται με τους μηχανισμούς χημειοπροφύλαξης. Οι πιθανοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες που

ερευνώνται ποικίλλουν ανάλογα με την πηγή, τη χημική δομή και τις επιδράσεις τους και περιλαμβάνουν μικροσυστατικά όπως οι βιταμίνες (φολικό οξύ και βιταμίνες Α, C και Ε), μεταλλικά στοιχεία (σελήνιο, μολυβδένιο, ασβέστιο), φυσικά προϊόντα (καροτενοειδή, ισοθειοκυανικά οξέα, φλαβονοειδή) και συνθετικά προϊόντα (παράγωγα βιταμίνης Α και D) (Greenwald et al., 1995).

Η απόλυτη κατηγοριοποίηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων δεν είναι εύκολη, εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης πολλών ενώσεων. Ένα σχήμα κατηγοριοποίησης αναπτύχθηκε αρχικά από τον Wattenberg και βασίζεται στη χρονική περίοδο κατά την οποία δρουν οι παράγοντες σε ζωικά μοντέλα καρκινογένεσης (Wattenberg, 1985, Morse et al., 1993). Με βάση αυτό το σχήμα, υπάρχουν τρεις τύποι χημειοπροφυλακτικών παραγόντων (Εικόνα 3).

1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου από πρόδρομες ουσίες (inhibitors of carcinogen formation). Αναστέλλουν συνήθως το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη, σε όξινο περιβάλλον. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής αποτελεί το ασκορβικό οξύ, το οποίο όταν υπάρχει σε αρκετή ποσότητα μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό νιτροζαμίνης. Ως αναστολείς σχηματισμού της νιτροζαμίνης δρουν και άλλες ενώσεις που περιλαμβάνουν φαινόλες, όπως το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ, καθώς και αρκετά διαφορετικά σουλφυδρυλικά συστατικά. Τα αμινοξέα προλίνη και θειοπρολίνη δεσμεύουν τα νιτρώδη, αντιδρώντας με αυτά έτσι ώστε να σχηματίσουν μη μεταλλαξογόνες νιτροζαμίνες. Η χρησιμότητα των παραγόντων αυτών περιορίζεται όσο αυξάνεται η έκθεση του ανθρώπου σε «προσχηματισμένα» καρκινογόνα. Παρόλα αυτά, μια πιθανή χρήση των παραγόντων αυτής της κατηγορίας θα μπορούσε να είναι η ενσωμάτωσή τους στη διατροφή ατόμων με αυξημένους ρυθμούς ενδογενούς σχηματισμού νιτροζαμινών.

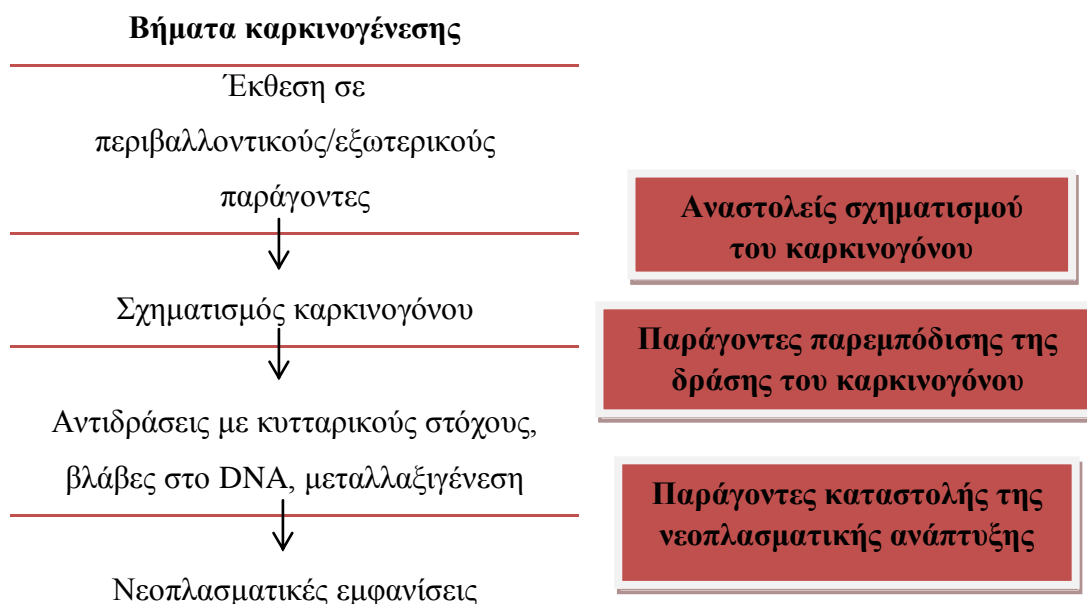
2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (“blocking” agents). Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογενετικής διαδικασίας, αποτρέποντας το καρκινογόνο να φτάσει και να αντιδράσει με τον στόχο του. Η δράση των παραγόντων αυτών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το μεταβολισμό των καρκινογόνων. Τα χημικά καρκινογόνα δρουν μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η τελική μορφή των καρκινογόνων είναι θετικά φορτισμένες ηλεκτρόφιλες ενώσεις. Κάποια από τα καρκινογόνα που δρουν απευθείας, έχουν εξ’αρχής αυτή τη μορφή, ενώ άλλα χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση.

Οι παράγοντες παρεμπόδισης διακρίνονται σε τρεις επιμέρους ομάδες, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους. Στην πρώτη ομάδα, ανήκουν ενώσεις που δρουν απλώς αναστέλλοντας την μετατροπή του προ-καρκινογόνου σε καρκινογόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι αποτελεσματικές μόνο έναντι καρκινογόνων που απαιτούν ενεργοποίηση από μια πρόδρομη μορφή. Μία δεύτερη κατηγορία παραγόντων παρεμπόδισης αποτελούν οι ενώσεις που επάγουν την ενίσχυση της ενεργότητας των ενζυμικών συστημάτων που καταλύουν τις αντιδράσεις «αποτοξικοποίησης» του καρκινογόνου. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών διακρίνεται σε δύο φάσεις, τις αντιδράσεις φάσης I και τις αντιδράσεις φάσης II. Οι αντιδράσεις φάσης I περιλαμβάνουν αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης και εισάγουν ή έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση μιας λειτουργικής ομάδας, η οποία μπορεί να μετατραπεί με μια αντίδραση σύζευξης σε μια υδατοδιαλυτή ένωση. Οι αντιδράσεις φάσης II περιλαμβάνουν αντιδράσεις σύζευξης, με τις οποίες γίνεται προσθήκη γλυκουρονικών ομάδων,θειικών ομάδων, σύνδεση με γλουταθειόνη (GSH), σύνδεση με αμινοξέα, ακετυλίωση ή μεθυλίωση, με σκοπό να αυξηθεί η υδροφιλικότητα των ξενοβιοτικών και να διευκολυνθεί η απέκκρισή τους. Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς προστατεύουν από την τοξικότητα διάφορων ενώσεων, στις οποίες ανήκουν και τα χημικά καρκινογόνα. Τα ενζυμικά συστήματα που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, και υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες που ενισχύουν την ενεργότητα των συστημάτων αυτών, στους οποίους ανήκουν αναστολείς ή επαγωγείς του κυτοχρώματος P-450 (το οποίο αποτελεί το πιο σημαντικό ενζυμικό σύστημα της φάσης I αλλά και γενικότερα του ξενοβιοτικού μεταβολισμού) και επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II (όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η UDP- γλυκουρονυλτρανσφεράση). Τέλος, στην τρίτη ομάδα παραγόντων παρεμπόδισης ανήκουν ουσίες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν τις ενεργές (ηλεκτρόφιλες) μορφές των καρκινογόνων. Η γλουταθειόνη είναι μια πυρηνόφιλη ένωση που ανήκει σε αυτή την ομάδα.

3. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης (“suppressing” agents). Αναστέλλουν την προοδευτική φάση της καρκινογένεσης. Η ταξινόμηση των παραγόντων καταστολής δεν είναι εύκολη, διότι τα πολύπλοκα γεγονότα και η αλληλουχία τους κατά τη διάρκεια της φάσης προόδου της καρκινογένεσης δεν είναι πλήρως κατανοητά. Παρόλα αυτά πολλοί παράγοντες καταστολής μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών, αναστολείς

του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, αναστολείς πρωτεασών, επαγωγείς της διαφοροποίησης, αναστολείς της έκφρασης των ογκογονιδίων, αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C, επαγωγείς της απόπτωσης, ενισχυτές της ανοσολογικής απόκρισης αναστολείς της οξειδωτικής καταστροφής του DNA και αναστολείς της αγγειογένεσης (*Morse et al., 1993, Wattenberg, 1985, Hursting et al., 1999*).

Παρόλο που η σημασία της χημειοπροφύλαξης στον καρκίνο είναι πολύ μεγάλη, ορισμένες μελέτες καταδεικνύουν ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση χημειοπροφυλακτικών προϊόντων, ειδικότερα σε περιπτώσεις ταυτόχρονης χορήγησης φαρμάκων και φυτικών συμπληρωμάτων. Γι'αυτό μελλοντικός στόχος των επιστημόνων είναι η ανάπτυξη χημειοπροφυλακτικών παραγόντων που θα βασίζονται σε στοχευμένες θεραπείες, με ανεκτή αλλά περιορισμένη τοξικότητα. Επιπλέον, η τροποποίηση των διατροφικών συνηθειών και η κατανάλωση θρεπτικών τροφών με γνωστή αντικαρκινική δράση (nutriceuticals) αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες χημειοπροφύλαξης απέναντι στον καρκίνο, τόσο για πληθυσμούς στους οποίους υπάρχει γενετική προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου όσο και για «φυσιολογικούς» (normal risk) πληθυσμούς (*Brenner et al., 2005, Kelloff et al., 2000, Wang et al., 2012*).

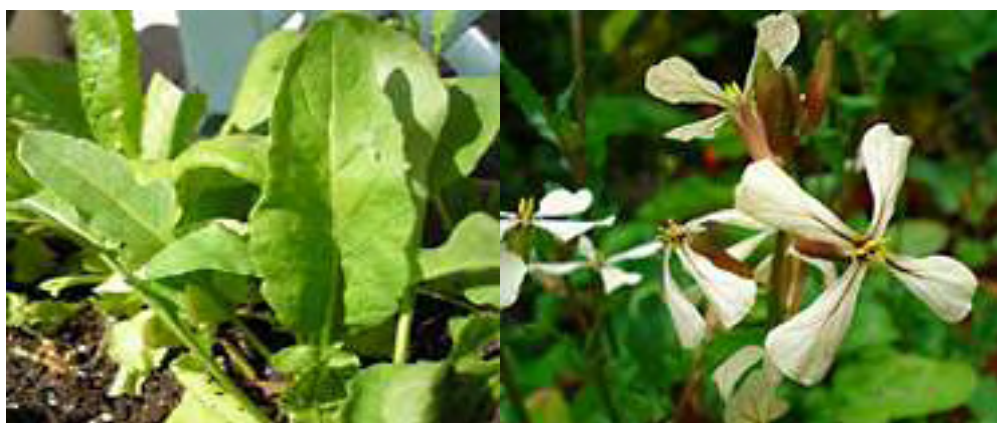


Εικόνα 3. Τα στάδια της καρκινογένεσης και οι δυνατότητες παρέμβασης με τη χρήση χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

2. Το φυτό ρόκα

Η ρόκα (*Eruca sativa*) είναι ένα μονοετές εδώδιμο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae (γνωστή και ως Cruciferae = σταυρανθή). Στην ίδια οικογένεια ανήκουν φυτά του γένους *Brassica* (ελαιοκράμβη, μπρόκολο, κουνουπίδι, λάχανο), το πιο γνωστό από τα οποία είναι το φυτό μοντέλο *Arabidopsis Thaliana*. Προέρχεται και ευδοκιμεί στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Μπορεί να συλλεχθεί από τη φύση σε άγρια μορφή ή να καλλιεργηθεί.

Η ρόκα χαρακτηρίζεται από σύντομο βιολογικό κύκλο των 6-9 εβδομάδων. Διαθέτει μικρό γονιδίωμα, της τάξης των 560 Mb, που κατανέμεται σε 22 χρωμοσώματα. Το ύψος του φυτού ανέρχεται στα 80-100 εκατοστά, το άνθος του είναι χρώμα άσπρου της κρέμας και έχει σταυρωτό σχήμα, τυπικό για την οικογένεια Brassicaceae. Το μικρό μέγεθος του φυτού, σε συνδυασμό με τη μεγάλη παραγωγή σπόρων, το καθιστά ιδανικό φυτό για εργαστηριακή μεταχείριση (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Το φυτό *Eruca sativa*

Η ρόκα καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό και τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος ως συστατικό σε σαλάτες και ως μπαχαρικό, κυρίως σε πληθυσμούς της Μέσης Ανατολής και της Ευρώπης. Από την εποχή του Μεσαίωνα χρησιμοποιείται σε θεραπείες με βότανα λόγω της περιεκτικότητας της σε ενώσεις που διαθέτουν διουρητική, στυπτική, ενυδατική, αποτοξινωτική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση (Uphof, 1968, Yaniv et al., 1998, Perry & Metzger, 1978), ενώ παράλληλα εμφανίζει ένα πλήθος χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία στομαχικών και νεφρικών διαταραχών, μολύνσεων του ματιού και σκορβούτου και διευκολύνει τη διαδικασία της πέψης (Varga et al., 2009). Η ρόκα αποτελεί επίσης πηγή βιταμινών, όπως η βιταμίνη C,

καροτενοειδών και πολυφαινολών, οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως αντιοξειδωτικά (Heimler *et al.*, 2007, Martinez-Sanchez *et al.*, 2008). Είναι αξιοσημείωτο ότι πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί μία συγκεκριμένη ένωση (ένας τύπος γλυκοσινολικού οξέος) που βρίσκεται στα φύλλα της ρόκας και εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση (Kim *et al.*, 2004). Παράλληλα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα αιθανόλης των σπόρων της ρόκας διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και επιδρά προστατευτικά στη ρινική τοξικότητα (Sarwar *et al.*, 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνδυασμού των παραπάνω ιδιοτήτων της ρόκας αποτελεί η προστατευτική δράση της απέναντι στο έλκος στομάχου (Alqasoumi *et al.*, 2009).

Στο ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων της ρόκας συμπεριλαμβάνονται αντιβακτηριακές (Khoobhandani *et al.* 2010, Gulfraz *et al.*, 2011) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η αντιβακτηριακή δράση της ρόκας αποδίδεται στο περιεχόμενό της σε ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση, όπως το ερουκικό οξύ (Alam *et al.*, 2007). Επιπλέον, μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι μια ομάδα ισοθειοκυανικών οξέων που βρίσκονται στα σπέρματα της ρόκας διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Yesuda *et al.*, 2009).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ρόκα διαθέτει προστατευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου (Michael *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα έλαια σπόρων του φυτού μπορούν να αναστείλλουν την ανάπτυξη μελανώματος (Khoobhandani *et al.* 2011). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα ρόκας προκαλούν αναστολή της ογκογένεσης σε, ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα (Melchini *et al.*, 2009) και σε ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα (HepG2) (Lamy *et al.*, 2008). Τέλος, *in vivo* μελέτες (σε ποντίκια), έχει αναδείξει την χημειοπροστατευτική ιδιότητα των εκχυλισμάτων ρόκας ενάντια στην καταστροφή που προκαλεί στο DNA η χρήση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα βινκριστίνη (vincristine), ο οποίος προκαλεί βλάβες στα κύτταρα του μυελού των οστών (Mahdy *et al.*, 2012).

Βασικό χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας Brassicaceae είναι η πικρή γεύση τους και η χαρακτηριστική οσμή τους. Οι ενώσεις που ευθύνονται για αυτά τα χαρακτηριστικά είναι γνωστές ως έλαια της μουστάρδας και αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στα φυτά αυτά. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα και η παρουσία τους στη συγκεκριμένη οικογένεια φυτών αποτελεί ένα σημαντικό γνώρισμά τους (Drewnowski *et al.*, 2000).

3. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών

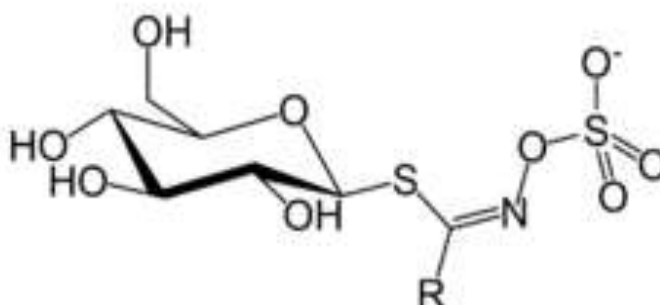
Τα φυτά, εκτός από τους ζωτικής σημασίας πρωτογενείς μεταβολίτες, διαθέτουν και έναν μεγάλο αριθμό μεταβολικών προϊόντων (πολύ μεγαλύτερο από εκείνον του πρωτογενούς μεταβολισμού) που παράγονται σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Ειδικότερα τα μόρια αυτά είναι γνωστά ως δευτερογενείς μεταβολίτες, επειδή προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολό τους συνιστούν το δευτερογενή μεταβολισμό. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες πιστεύεται ότι δεν παίζουν άμεσο ρόλο στην διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών του φυτού, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή, αν και πρόσφατα δεδομένα ανατρέπουν σταδιακά αυτή την άποψη. Ωστόσο, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την επιβίωση των φυτών. Συνήθως τα δευτερογενή αυτά προϊόντα βρίσκονται μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε μία ταξινομικά συγγενική ομάδα φυτικών ειδών, ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες (υδατάνθρακες, αμινοξέα, λίπη, νουκλεοτίδια) βρίσκονται σε όλα τα μέλη του φυτικού βασιλείου. Είναι αξιοσημείωτο επίσης, ότι τα δευτερογενή φυτικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο για μια ποικιλία εφαρμογών, για παράδειγμα φάρμακα (κινίνη), διεγερτικά (καφεΐνη, νικοτίνη, κοκαΐνη), παραισθησιογόνα (μορφίνη, κωδεΐνη), δηλητήρια (κώνειο), καρυκεύματα (αρώματα, χρωστικές).

Γενικά, ο βιολογικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών είναι να ενισχύουν την ανταγωνιστικότητα των φυτών στα αντίστοιχα οικοσυστήματα που ευδοκιμούν. Τα φυτά, λόγω της σταθερής και μόνιμης θέσης τους, δεν είναι σε θέση να απομακρυνθούν, ώστε να αποφύγουν τους εχθρούς τους. Παρόλα αυτά προστατεύονται με άλλους τρόπους, αναπτύσσοντας διάφορους μηχανισμούς, που τις περισσότερες φορές αναγκάζουν τους εχθρούς τους να τα αποφεύγουν ή και να απομακρύνονται. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν ένα τέτοιο μηχανισμό, καθώς αποτρέπουν, ή προκαλούν βλάβες ή ακόμη και σκοτώνουν τους φυτοφάγους οργανισμούς και τα παθογόνα μικρόβια. Επομένως, οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία της επιφάνειας και στην άμυνα των φυτών έναντι των ποικίλων εχθρών τους. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παίζουν σημαντικό ρόλο γενικά στην προσαρμογή των φυτών στις αλλαγές του περιβάλλοντος, αλλά και στην αντιμετώπιση στρεσογόνων καταστάσεων, μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος βιοχημικών μηχανισμών και λειτουργιών (*Endreva et al., 2008, Hadacek, 2002*).

Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 100.000 δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά και αποτελούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια.

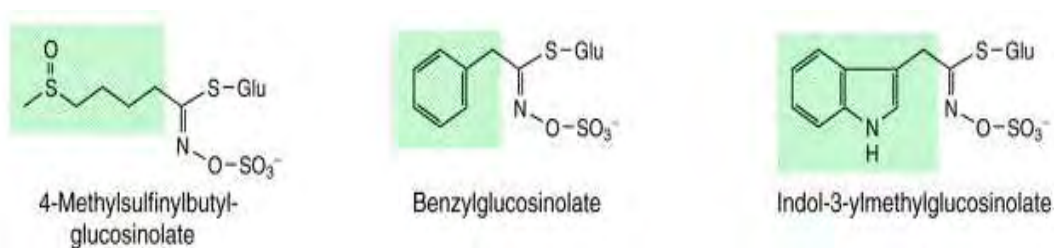
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο βιοσύνθεσής τους: τερπένια, φαινόλες και συστατικά που περιέχουν άζωτο (Εικόνα 5). Τα τερπένια είναι προϊόντα λιπιδικής φύσης που συντίθενται από το Ακετυλο-CoA μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος ή εναλλακτικά μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής 2-μεθυλ-D-ερυθριτόλης από προϊόντα της φωτοσύνθεσης ή της γλυκόλυσης (Taiz & Zeiger, 2010). Οι φαινόλες είναι αρωματικά συστατικά που σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος ή του μονοπατιού του μαλονικού οξέος με διάφορους τρόπους. Οι αζωτούχες ενώσεις συντίθενται πρωτογενώς από αμινοξέα. Το άτομο του αζώτου είναι συνήθως μέλος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, ενός δακτυλίου δηλαδή που περιέχει τόσο το άτομο του αζώτου όσο και άτομα άνθρακα, και προέρχεται από την αμινομάδα των αμινοξέων, από τα οποία συντίθενται οι αζωτούχες ενώσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα αλκαλοειδή, τα κυανογόνα γλυκοζίδια και τα γλυκοσινολικά οξέα (Taiz & Zeiger, 2010).

σημειωθεί ότι συγκριτικά με άλλα καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες, η ρόκα εμφανίζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκοσινολικών οξέων τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες (Fahey *et al.*, 2001, Jin *et al.*, 2009).



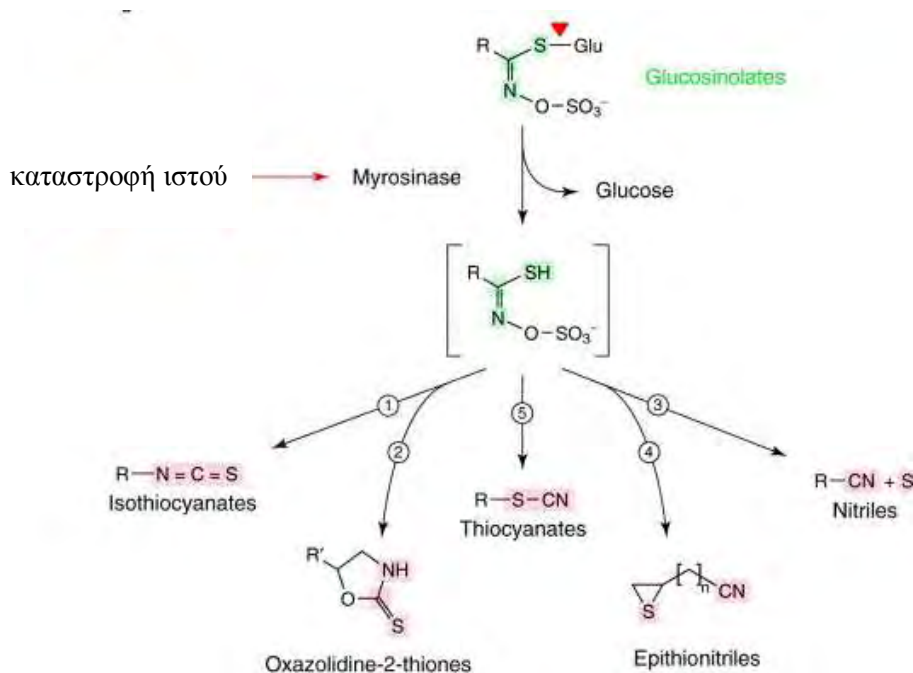
Εικόνα 6. Δομή γλυκοσινολικών οξέων.

Τα γλυκοσινολικά οξέα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τα αμινοξέα από τα οποία παράγονται, και κατά συνέπεια ανάλογα με την πλευρική αλυσίδα του κάθε μορίου. Δηλαδή, ανάλογα με το αν προέρχονται από αλειφατικά αμινοξέα (μεθειονίνη), αρωματικά αμινοξέα (φαινυλαλανίνη) ή τρυπτοφάνη διακρίνονται σε αλειφατικά, αρωματικά και ινδολικά αντίστοιχα (Εικόνα 7) (Wittstock & Halkier, 2002). Η ποικιλία στη δομή των γλυκοσινολικών οξέων οφείλεται, εκτός από τα πρόδρομα αμινοξέα, στην ποικιλομορφία του μήκους της πλευρικής αλυσίδας και στα διαφορετικά μοτίβα δευτερογενούς οξείδωσης και εστεροποίησης. Επιπλέον, η συγκέντρωση και η σύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο αλλά και από το σημείο του φυτού από το οποίο προέρχονται (Textor *et al.*, 2004).



Εικόνα 7. Οι τρεις κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων.

Οι περισσότερες βιολογικές ενεργότητες των γλυκοσινολικών οξέων προκύπτουν από τα προϊόντα υδρόλυσής τους. Τα γλυκοσινολικά οξέα υδρολύονται από το ένζυμο μυροσινάση, που είναι μία θειο-γλυκουδρολάση. Το ένζυμο αυτό είναι αποθηκευμένο χωριστά από τα γλυκοσινολικά οξέα, στο χυμοτόπιο ή σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης. Η μυροσινάση έρχεται σε επαφή με τα γλυκοσινολικά οξέα μετά τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και καταλύει την υδρόλυσή τους. Συγκεκριμένα, η μυροσινάση υδρολύει το θειογλυκοσιδικό δεσμό και απελευθερώνεται έτσι μία αγλυκόνη, η οποία μπορεί είτε να αναδιαταχθεί σε ένα ισοθειοκυανικό οξύ είτε να μετατραπεί σε εναλλακτικά προϊόντα, ανάλογα με την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένων δομικών προϋποθέσεων (*Wittstock & Borrow, 2010*). Γενικά, τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: ισοθειοκυανικά οξέα, οξαζολιδινο-2-θειόνες, θειοκυανικά οξέα, επιθειονιτρίλια και νιτρίλια. Σε ουδέτερο pH, οι ασταθείς αγλυκόνες, όπως αναφέρθηκε, αναδιατάσσονται για να σχηματίσουν ισοθειοκυανικά οξέα. Αν η πλευρική αλυσίδα υδροξυλιωθεί στον άνθρακα 3, η αυθόρμητη κυκλοποίηση του ισοθειοκυανικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας οξαζολιδινο-2-θειόνης. Παρουσία ενός θειοειδικού παράγοντα (εξειδικευμένη πρωτεΐνη) σχηματίζονται νιτρίλια. Αν υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας, το άτομο του θείου που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του νιτρίλιου προσλαμβάνεται από το διπλό δεσμό, σχηματίζοντας θειονιτρίλια. Τέλος, μερικά γλυκοσινολικά οξέα μπορούν να υδρολυθούν προς θειοκυανικά (Εικόνα 8) (*Wittstock & Halkier, 2002*).



Εικόνα 8. Τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων.

3. 2. Επίδραση της θεικής και της αζωτούχας λίπανσης στα γλυκοσινολικά οξέα

Πολλά από τα στοιχεία του εδάφους λειτουργούν ως μεταλλικά θρεπτικά συστατικά για τα φυτά. Μεταξύ αυτών το άζωτο και το θείο είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών, καθώς αποτελούν συστατικά σημαντικών πρωτογενών και δευτερογενών ενώσεων. Συγκεκριμένα, το θείο βρίσκεται σε αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, βιταμίνες και συμπράγοντες και σε μία ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ το άζωτο απαιτείται για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων και πολλών δευτερογενών μεταβολιτών.

Τα γλυκοσινολικά οξέα, όπως φαίνεται και από τη δομή τους είναι πλούσια σε θείο και άζωτο. Σε ένα μόριο γλυκοσινολικού οξέος υπάρχουν 2 ή 3 άτομα θείου, ένα από το μόριο της κυστεΐνης για τη δημιουργία του θειογλυκοσιδικού δεσμού, ένα από τη θεική ομάδα και ένα από τη μεθειονίνη, σε περίπτωση που το πρόδρομο αμινοξύ είναι η μεθειονίνη. Ο σχηματισμός των γλυκοσινολικών οξέων είναι ο λόγος για τον οποίο τα φυτά του γένους *Brassica* έχουν υψηλή απαίτηση θείου. Η συγκέντρωση και το προφίλ των γλυκοσινολικών οξέων επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η παροχή θείου αυξάνει το περιεχόμενο των γλυκοσινολικών οξέων. Η λίπανση με θείο δεν επηρεάζει μόνο το συνολικό ποσό των γλυκοσινολικών οξέων αλλά και τη συσσώρευση μεμονωμένων γλυκοσινολικών

οξέων σε διάφορα είδη Brassica. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ισοθειοκυανικά οξέα (ITCs), που θεωρούνται τα πιο σημαντικά, φαρμακολογικά, προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των ITCs επηρεάζεται από την παροχή αζώτου και θείου με τρόπο ανάλογο με αυτό των γλυκοσινολικών οξέων (Gerendas *et al.*, 2008).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών οδήγησαν σε αντικρουόμενα συμπεράσματα όσον αφορά τις επιδράσεις της αζωτούχας λίπανσης και της αλληλεπίδρασής της με τη θειική λίπανση, με τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων και τη σύσταση τους στα φυτά. Στοχεύοντας στην ενίσχυση του σχηματισμού γλυκοσινολικών οξέων θεωρείται ότι είναι απαραίτητη μια ισορροπία μεταξύ αζωτούχας και θειικής λίπανσης, η οποία είναι ανάλογη του είδους του φυτού αλλά και διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων. Έτσι, για κάθε είδος φυτού υπάρχει μια βέλτιστη αναλογία N:S (Li *et al.*, 2007, Schonhof *et al.*, 2007, Omirova *et al.*, 2009, 2012). Επομένως, με κατάλληλη λίπανση θείου και αζώτου μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωση γλυκοσινολικών στα φυτά του γένους Brassica, ενώ παράλληλα η καλλιέργεια των συγκεκριμένων φυτών με φυτά άλλου είδους (non-Brassica) μπορεί να βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση (Stavridou *et al.*, 2012).

3. 3. Βιολογικές δράσεις των γλυκοσινολικών οξέων στα φυτά και στον άνθρωπο

Είναι γνωστό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, στους οποίους ανήκουν τα γλυκοσινολικά οξέα, συμμετέχουν στην προστασία των ιστών του φυτού από το οποίο προέρχονται και επηρεάζουν μια σειρά σημαντικών λειτουργιών, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Ειδικότερα παρεμβαίνουν ως εξειδικευμένα σήματα για τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών και προστατεύουν τους ιστούς από αβιοτικές καταπονήσεις, μέσω του συστήματος γλυκοσινολικών-μυροσινάσης, ενώ ορισμένα προϊόντα αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών οξέων εμπλέκονται στη θρέψη των φυτών και στη ρύθμιση της ανάπτυξής τους (Hadacek, 2002, Grubb & Abel, 2006). Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι περισσότερο γνωστά εξαιτίας των αντιμικροβιακών και αμυντικών ιδιοτήτων που διαθέτουν τα προϊόντα υδρόλυσής τους, γι' αυτό και έχουν χαρακτηριστεί ως βιολογικά παρασιτοκτόνα (Mithen, 1992, Agrawal & Kurashige, 2003). Επιπλέον, τα γλυκοσινολικά οξέα είναι υπεύθυνα για τη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα των σταυρανθών λαχανικών και μπαχαρικών, τα οποία οφείλονται στα έλαια μουστάρδας που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των γλυκοσινολικών οξέων. Εκτός από τη

σημαντική βιολογική τους δράση στην άμυνα των φυτών, τα γλυκοσινολικά οξέα παρουσιάζουν ωφέλιμες επιδράσεις και στην υγεία του ανθρώπου. Γενικά τα φυτοχημικά, οι ουσίες που παράγονται από φυτά, είναι γνωστό ότι έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες, γι' αυτό και η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου για πολλές χρόνιες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Block *et al.*, 1992, Steinmetz & Potter, 1996). Πιστεύεται ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων και συγκεκριμένα τα ισοθιοκυανικά οξέα, ευθύνονται για τις προστατευτικές επιδράσεις των σταυρανθών λαχανικών στην υγεία του ανθρώπου (Mithen, 2000, 2001, Juge *et al.*, 2007).

Τα ισοθιοκυανικά οξέα διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα NF-κΒ και στην αναστολή του TNF-α και της μεσολαβούμενης από λιποπολυσακχαρίτη (LPS) φλεγμονώδους απόκρισης (Heiss *et al.*, 2001). Επιπλέον, είναι γνωστές οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των ισοθιοκυανικών οξέων απέναντι στο βακτήριο *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου (Fahey *et al.*, 2002). Πειράματα σε ζώα-μοντέλα με έμφραγμα του μυοκαρδίου ανέδειξαν τις προστατευτικές επιδράσεις των ισοθιοκυανικών οξέων, και συγκεκριμένα εκείνων που περιέχονται στο μπρόκολο, ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Cornelis *et al.* 2007). Τέλος, έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση των ισοθιοκυανικών οξέων. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι τα ισοθιοκυανικά οξέα εμφανίζουν τόσο αντιοξειδωτική όσο και προ-οξειδωτική δράση. Προ-οξειδωτικά ονομάζονται οι ενώσεις που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες *in vivo*, είτε καταστρέφοντας τα συστήματα άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες είτε ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Η «διπλή» αυτή ιδιότητα των ισοθιοκυανικών οξέων η οποία οφείλεται στην επαγωγή των ενζύμων φάσης I και II του μεταβολισμού, όπως αναλύεται πιο κάτω, προκαλεί προβληματισμό. Παρόλα αυτά πιστεύεται ότι το πλήθος των αντιοξειδωτικών ενώσεων που περιέχονται στα ισοθιοκυανικά οξέα εξουδετερώνουν την προ-οξειδωτική τους φύση (Valgimigli & Iori, 2009).

3.1.1. Αντικαρκινική δράση γλυκοσινολικών οξέων

Στα πλαίσια της εκτεταμένης έρευνας που πραγματοποιείται τα τελευταία χρόνια για τον καρκίνο εντάσσονται και πολλές έρευνες σχετικά με τις αντικαρκινικές ιδιότητες

των γλυκοσινολικών οξέων. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά φυτά που ανήκουν στο γένος *Brassica*, που είναι πλούσια σε γλυκοσινολικά οξέα, εμφανίζουν προστατευτικές ιδιότητες ενάντια σε πολλούς τύπους καρκίνου (*Verhoeven et al., 1996, Cartea & Velasco, 2008, Traka & Mithen, 2009*). Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει μια ανάδρομη σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση σταυρανθών λαχανικών και στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (*London et al., 2000; Spitz et al., 2000; Zhao et al., 2001; Wang et al., 2004b*), του στομάχου (*Hansson et al., 1993*), του παχέος εντέρου (*Lin et al., 1998; Seow et al., 2002*), του μαστού (*Fowke et al. 2003; Ambrosone et al. 2004*), των ωοθηκών (*Zhao et al., 2007*) και του προστάτη (*Cohen et al., 2000; Giovannucci et al., 2003; Kirsh et al., 2007*). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση 1-2 μερίδων μπρόκολου την εβδομάδα μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη (*Traka et al., 2008*).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα προϊόντα αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών οξέων επηρεάζουν διάφορα στάδια της ανάπτυξης καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ισοθειοκυανικά οξέα και οι ινδολικοί μεταβολίτες των γλυκοσινολικών οξέων (*Velasco et al., 2011, Traka et al., 2009 Musk et al., 1995*). Συγκεκριμένα, η χορήγηση ισοθειοκυανικών οξέων σε πειραματικά μοντέλα ζώων απέτρεψε το σχηματισμό όγκων που επάγονται από καρκινογόνα, σε διάφορες θέσεις όπως μαστό, στομάχι, έντερο και πνεύμονες (*Sugie et al., 1994, Zhang et al., 1994, Gerhauser et al., 1997, Chung et al., 2000, Fahey et al., 2002, Conaway et al., 2005*).

Οι μηχανισμοί δράσης που σχετίζονται με τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των ισοθειοκυανικών οξέων εμπλέκονται σε πολλά μονοπάτια της καρκινογένεσης και των χρόνιων ασθενειών. Αρχικά, εμπλέκονται στη ρύθμιση του ξενοβιοτικού μεταβολισμού, με σκοπό την προστασία από περιβαλλοντικούς παράγοντες, επάγοντας τα ένζυμα αποτοξίνωσης (ένζυμα φάσης II) και αναστέλλοντας τα ένζυμα φάσης I του μεταβολισμού. Η επώαση ηπατοκυττάρων ανθρώπου και αρουραίου με τη σουλφοραφάνη (*sulforaphane*), που αποτελεί το πιο καλά μελετημένο ισοθειοκυανικό οξύ που παράγεται από το μπρόκολο είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας πολλών μελών της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (*Barcelo et al., 1996, Maheo et al., 1997, Juge et al., 2007*). Επιπλέον, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν την επαγωγή ενζύμων της φάσης II από ισοθειοκυανικά οξέα, στα οποία συμπεριλαμβανόταν και η σουλφοραφάνη (*Mithen et*

al., 2003, *Bogaards et al.*, 1994, *Razis et al.*, 2010). Τέλος, προϊόντα γλυκοσινολικών οξέων που απαντώνται στο μαύρο ισπανικό ραδίκι, ένα λαχανικό που ανήκει στην κατηγορία των σταυρανθών, προκαλούν επαγωγή των ενζύμων αποτοξίνωσης σε ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα HepG2 (*Hanlon et al.*, 2007).

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των ισοθιοκυανικών οξέων αφορά στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Τα ισοθιοκυανικά οξέα ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων, είτε επάγοντας τα ένζυμα της φάσης II, όπως προαναφέρθηκε, είτε αυξάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης, ένα ένζυμο που διατηρεί την ισορροπία οξειδωσης αναγωγής στα κύτταρα και τα προστατεύει από τις ελεύθερες ενεργές ρίζες (*Ye & Zhang*, 2001). Ένα ακόμη φυτό της κατηγορίας των σταυρανθών, το οποίο έχει μελετηθεί για τις αντικαρκινικές του ιδιότητες είναι το κινέζικο λάχανο. Έχει βρεθεί ότι η σουλφοραφάνη και εκχυλίσματα του κινέζικου λάχανου προστατεύουν επιθηλιακά ηπατοκύτταρα αρουραίων από την επαγόμενη από υπεροξειδίου του υδρογόνου αναστολή της διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω χασμοσυνδέσμων. Ο μοριακός μηχανισμός της δράσης αυτής αφορά την αναστολή των ERK1/2 και p38 MAPK κινασών (*Hwang et al.*, 2005).

Τέλος, οι προστατευτικές ιδιότητες των ισοθιοκυανικών οξέων βασίζονται στην αναστολή της ανάπτυξης των όγκων. Αυτό μπορεί να συμβεί με μηχανισμούς που καταστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και την αγγειογένεση, καθώς και με μηχανισμούς που επάγουν την απόπτωση. Η επαγωγή της απόπτωσης επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και μέσω της ρύθμισης της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 και του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK κινασών, που έχουν ως συνέπεια την ενεργοποίηση των κασπασών. Αντίστοιχα, η καταστολή του κυτταρικού κύκλου γίνεται στοχεύοντας τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (*Clarke et al.*, 2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα του συγκεκριμένου μηχανισμού δράσης των ισοθιοκυανικών οξέων αποτελούν εκείνα που αναστέλλουν την ενεργότητα του πρωτεασώματος και επάγουν την καταστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό κυττάρων πολλαπλού μυελώματος (*Mi et al.*, 2010).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι ο καρκίνος μπορεί να αποτραπεί σε ποσοστό 30-40% μέσω κατάλληλης διατροφής. Η κατανάλωση των φυτών του γένους Brassica λόγω της ύπαρξης γλυκοσινολικών οξέων φαίνεται ότι έχει ιδιαίτερα ωφέλιμες επιδράσεις απέναντι στον καρκίνο. Παρά το γεγονός ότι η μελέτη των μηχανισμών δράσης των

γλυκοσινολικών οξέων έναντι του καρκίνου έχει αναδείξει μια πληθώρα πιθανών προστατευτικών μηχανισμών, είναι απαραίτητο να διευκρινιστεί μελλοντικά ο ακριβής τρόπος με τον οποίο λειτουργούν *in vivo*.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων του φυτού ρόκας στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα που προέρχονται από φυτά ρόκας τα οποία αναπτύχθηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες λίπανσης, όσον αφορά την περιεκτικότητα αζώτου και θείου. Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από διαφορετικά τμήματα του φυτού, και συγκεκριμένα από τα φύλλα και τις ρίζες. Σε προηγούμενη μελέτη προσδιορίστηκε η σύσταση και η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα διαφορετικά εκχυλίσματα, καθώς και η επίδρασή τους στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των εκχυλισμάτων με χρήση χρωματογραφίας Sephadex, με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα, και στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών κλασμάτων στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa, MCF-7 και HepG2.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

- **PBS** (Phosphate Buffered Saline, 1X): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 20012-019). Περιέχει 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.2. Χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των κυττάρων πριν από την επεξεργασία τους με τρυψίνη, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού που υπάρχουν στη φλάσκα καλλιέργειας, τα οποία δρουν ανασταλτικά στη δράση της τρυψίνης.
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X): θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 41966-052). Περιέχει 4500 mg/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ.
- **FBS** (Fetal Bovine Serum): βόειος εμβρυϊκός ορός (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 10270-106). Παρέχει στα κύτταρα τους αυξητικούς παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Πριν από τη χρήση ο ορός απενεργοποιείται με θέρμανση (στους 55 °C για μισή ώρα), ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και αποθηκεύεται στους - 20 °C. Η τελική συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας είναι 10%.
- **Αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη**. Παρέχονται από την εταιρεία Gibco, σε διάλυμα 100X (αριθμός καταλόγου 15140-122). Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται για την προστασία των κυτταρικών καλλιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι 100 units/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης.
- **Διάλυμα τρυψίνης 0.5% (10X) σε EDTA** (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 15400-054). Περιέχει 5.0 g/L τρυψίνη (1:250), 2 g/L of EDTA•4Na και 8.5 g/L of NaCl (10X). Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τα πιάτα καλλιέργειας. Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X μετά από αραίωση σε διάλυμα PBS.
- **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)** (εταιρεία Sigma, αριθμός καταλόγου D2650). Το DMSO δρα ως κρυπροστατευτικός παράγοντας, αλλάζοντας τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και εμποδίζοντας το σχηματισμό πολλών κρυστάλλων

νερού κατά το πάγωμα των κυττάρων. Προλαμβάνει έτσι την καταστροφή των κυττάρων από την κρυστάλλωση του νερού. Η τελική του συγκέντρωση στο υλικό παγώματος των κυττάρων είναι 10%.

- **XTT Cell Proliferation Kit II** (εταιρεία Roche, αριθμός καταλόγου 11 465 015 001). Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης.

2. Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό για την παραλαβή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από φυτά ρόκας (*Eruca sativa*), τα οποία καλλιεργήθηκαν για τριανταπέντε ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Τα φυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Οι συνθήκες καλλιέργειας καθώς και οι διαφορές σε κάθε μεταχείριση περιγράφονται παρακάτω.

Αρχικά οι σπόροι απολυμάνθηκαν με διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου για 5 λεπτά. Αφού ξεπλύθηκαν με νερό τοποθετήθηκαν για δύο ημέρες σε τρυβλία με διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με νερό για προβλάστηση. Στη συνέχεια τα νεαρά φυτά φυτεύτηκαν σε γλάστρες με αποστειρωμένο περλίτη.

Οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων έγκεινται σε τροποποιήσεις ως προς τη χορήγηση αζώτου και θείου. Ετοιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά διαλύματα Hoagland για το πότισμα των φυτών της κάθε μεταχείρισης. Το διάλυμα για την πρώτη μεταχείριση ήταν πλήρες σε άζωτο (114 mg/L) και θείο (32 mg/L), το διάλυμα για τη δεύτερη μεταχείριση είχε μειωμένη τη συγκέντρωση του αζώτου (14 mg/L), το διάλυμα για την τρίτη μεταχείριση είχε μειωμένη τη συγκέντρωση του θείου (0,019 mg/L) και το διάλυμα για την τέταρτη μεταχείριση είχε μειωμένη τη συγκέντρωση του αζώτου (14 mg/L) και του θείου (0,019 mg/L).

Τα φυτά ποτίζονταν κάθε δεύτερη μέρα εναλλάξ με νερό τη μία φορά και με το αντίστοιχο διάλυμα για την κάθε μεταχείριση την επόμενη. Το διάλυμα Hoagland εφαρμόστηκε σταδιακά σε αραιώσεις 25%, 50% και τελικά 100%. Οι δόσεις που εφαρμόστηκαν αυξάνονταν με την αύξηση των φυτών.

Η δειγματοληψία των φυτών έγινε ως εξής: κάθε φυτό εκριζώθηκε από τη γλάστρα με προσοχή και χωρίς να σημειωθούν απώλειες οποιουδήποτε τμήματος φυτικού ιστού. Αφαιρέθηκαν οι κοτυληδόνες και διαχωρίστηκαν το ριζικό τμήμα και τα φύλλα του κάθε φυτού. Κάθε κομμάτι συλλεγόμενου ιστού μεταφερόταν κατευθείαν σε υγρό άζωτο. Έτσι μετά το τέλος της διαδικασίας είχαν συλλεχθεί για

κάθε μεταχείριση τόσο φύλλα όσο και ρίζες χωριστά. Οι ιστοί αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια σε θερμοκρασία -80 °C.

2.1. Εκχύλιση γλυκοσινολικών οξέων

Οι αποθηκευμένοι ιστοί θρυμματίστηκαν με χρήση υγρού αζώτου και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, χωριστά για κάθε μεταχείριση. Στη συνέχεια έγινε αποξήρανση των δειγμάτων με φυγοκεντρικό συμπυκνωτή (χρόνος 24h, πίεση 5.1 Torr, θερμοκρασία 45°C).

Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ζεστή μεθανόλη 70% σε αναλογία 1:2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος. Επανάληψη δυο φορές της διαδικασίας με τη μεθανόλη και ένωση των υπερκείμενων που λήφθηκαν.

Αφού έγινε μια φυγοκέντρηση για απομάκρυνση των ιζημάτων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φυγοκεντρικό συμπυκνωτή με πίεση 5.1 Torr και θερμοκρασία 45°C, ώσπου ο όγκος του κάθε δείγματος να συμπυκνωθεί στο 20-30% του αρχικού.

Τα δείγματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού ψευδάργυρου 1 M (10 μl για κάθε 0,5 ml δείγματος) και τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία στους 4 °C για 2-3 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (10.000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά) και συλλογή του υπερκείμενου.

Στον πίνακα 1 φαίνεται η αρχική ποσότητα δείγματος κάθε μεταχείρισης και η τελική συγκέντρωση στο εκχύλισμα.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΗ	ΑΡΧΙΚΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ (mg)	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ (mg)	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (ml)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ml)
N+/S+ ΦΥΛΛΑ	21400	2400	2.5	960
N+/S+ ΡΙΖΕΣ	10000	1200	1.2	1000
N-/S+ ΦΥΛΛΑ	2400	500	1.5	333
N-/S+ ΡΙΖΕΣ	2300	300	1.4	214
N+/S- ΦΥΛΛΑ	8300	1100	2.9	379
N+/S- ΡΙΖΕΣ	1400	100	0.6	166
N-/S- ΦΥΛΛΑ	1800	400	0.65	615

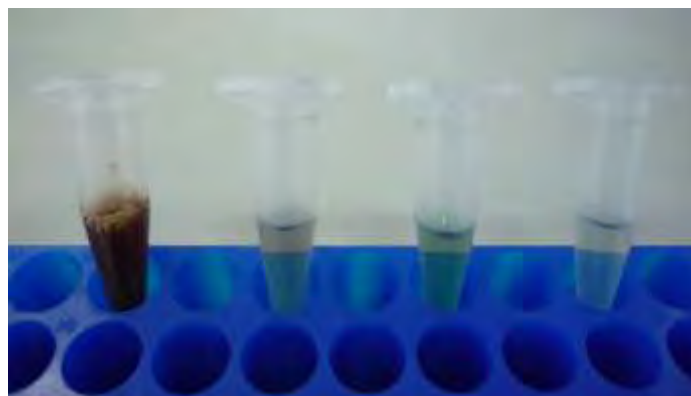
Πίνακας 1. Ποσότητες δειγμάτων κάθε μεταχείρισης στα διάφορα στάδια της επεξεργασίας τους.

Ετοιμάστηκε στήλη Sephadex G50 με ρυθμιστικό διάλυμα 2 M CH₃COONa-CH₃COOH pH 5.6 και κατάλληλη ποσότητα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας των 14 ml (3 ml bed volume για κάθε 0.5 ml δείγματος) (*Barillari et al., 2001*).

Φορτώθηκε 0.5 ml από κάθε δείγμα και διαδοχικά παραλήφθηκαν οι παρακάτω εκλούσεις :

- Διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O) 4 ml
- Μεθανόλη 1 ml
- 0.1 M KNO₃ 2 ml
- 0.1 M K₂SO₄ 4 ml

Στη συνέχεια όλα τα παραπάνω κλάσματα συμπυκνώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε ddH₂O (Εικόνα 9), έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν την ίδια συγκέντρωση (415 mg/ml), με βάση την αρχική συγκέντρωση των εκχυλισμάτων, όπως αυτή φαίνεται στον πίνακα 1.



Εικόνα 9. Τα τέσσερα διαφορετικά κλάσματα μετά τις διαδοχικές εκλούσεις από τη στήλη Sephadex G50

3. Καρκινικές κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa (ενδομητριάκο αδενοκαρκίνωμα), MCF-7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού) και HepG2 (ηπατικό αδενοκαρκίνωμα).

Τα κύτταρα HeLa προέρχονται από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και αποτελούν την πιο παλιά και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη κυτταρική σειρά. Απομονώθηκαν από ένα επιθετικό αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας μιας γυναίκας ασθενούς (Henrietta Lacks) περίπου 60 χρόνια πριν και έκτοτε αποτελούν ένα πολύ βασικό «εργαλείο» στην έρευνα για τον καρκίνο. Στο όνομα αυτής της γυναίκας οφείλεται και η ονομασία τους. Τα κύτταρα HeLa πολλαπλασιάζονται πάρα πολύ γρήγορα, συγκρινόμενα ακόμη και με άλλα καρκινικά κύτταρα. Όπως και πολλά άλλα καρκινικά κύτταρα, διατηρούν μια ενεργή μορφή της τελομεράσης που αποτρέπει την αυξανόμενη βράχυνση των τελομερών, η οποία εμπλέκεται στη γήρανση και στον κυτταρικό θάνατο. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα HeLa παρακάμπτουν το όριο Hayflick, που είναι ο περιορισμένος αριθμός διαιρέσεων που πραγματοποιούν τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα προτού πεθάνουν, σε μια κυτταροκαλλιέργεια.

Τα κύτταρα MCF-7 προέρχονται από ανθρώπινο μαστικό αδενοκαρκίνωμα και συγκεκριμένα απομονώθηκαν το 1970 από μία 69-χρονη γυναίκα με καρκίνο του μαστού. MCF-7 είναι το ακρωνύμιο του Michigan Cancer Foundation-7, του ινστιτούτου όπου καθιερώθηκε η εν λόγω κυτταρική σειρά το 1973. Τα κύτταρα αυτά έχουν υποδοχείς οιστρογόνων, ενώ η ανάπτυξή τους αναστέλλεται από τον TNFα.

(Tumor Necrosis Factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων). Κυτταρογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι πρόκειται για μια κυτταρική σειρά 88 χρωμοσωμάτων, η οποία είναι η πρώτη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που αποκρίνεται σε ορμόνες (hormone-responsive).

Τα κύτταρα HepG2 προέρχονται από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και μεγαλώνουν σε μονοστιβάδες και συσσωματώματα. Έχουν πρότυπο χρωμοσωμικό αριθμό 55 και εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη, το ινωδογόνο, η α-2-μικροσφαιρίνη και το πλασμινογόνο. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε ερέθισμα με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη. Εξαιτίας τόσο της μορφολογικής όσο και της λειτουργικής ποικιλομορφίας τους *in vitro*, αποτελούν ένα χρήσιμο σύστημα μοντέλο για τη μελέτη των ηπατοκυττάρων και κατά συνέπεια ασθενειών που σχετίζονται με το ήπαρ. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται σε μελέτες του μεταβολισμού του ήπατος και της τοξικότητας των ξενοβιοτικών καθώς και σε μελέτες κατανόησης της ηπατοκαρκινογένεσης.

Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood) της εταιρείας Tel Star AV-30/70.

3.1. Συντήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια μέσα σε επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες των 25 cm² (T₂₅) ή των 75 cm² (T₇₅). Είναι σημαντικό σε κάθε φλάσκα να αναγράφεται το πέραςμα (passage) της κάθε καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αποτελείται από θρεπτικό μέσο DMEM ενισχυμένο με ορό FBS (τελικής συγκέντρωσης 10% κατ'όγκον) και παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (σε τελική συγκέντρωση 100 units/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα). Για την αποφυγή ενεργοποίησης του συμπληρώματος, ο ορός υφίσταται απενεργοποίηση με θέρμανση για 30 λεπτά στους 55 °C (heat inactivation). Πριν τη χρήση τους όλα τα αντιδραστήρια προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο 37 °C. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι να καλύψουν περίπου το 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες και η κατάσταση των κυττάρων ελέγχεται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (εταιρεία Kruss). Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο

της εταιρείας RS BIOTECH, σε θερμοκρασία 37 °C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-80% της φλάσκας καλλιέργειας πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια και πέρασμα σε νέα φλάσκα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur που είναι συνδεδεμένη σε αντλία κενού. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS, με σκοπό να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού που περιέχονται στο θρεπτικό υλικό, ο οποίος απενεργοποιεί την τρυψίνη. Ο όγκος του PBS ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας, ενδεικτικά είναι 5 ml για την T₂₅ και 10 ml για την T₇₅. Για την αποκόλληση των κυττάρων από το πιάτο καλλιέργειας προστίθεται διάλυμα τρυψίνης-EDTA (1X). Η τρυψίνη διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και με το στερεό τους υπόστρωμα. Ο όγκος του διαλύματος τρυψίνης που χρησιμοποιείται ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας. Ενδεικτικά χρησιμοποιείται 0,75 ml για την T₂₅ και 1,5 ml για την T₇₅. Η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο επώασης (37 °C) για λίγα λεπτά. Εναλλακτικά, μπορεί να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να δράσει η τρυψίνη. Είναι απαραίτητο να γίνει επιπλέον και μηχανική ανάδευση με πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολουθώντας στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο, ώστε να αδρανοποιηθεί η τρυψίνη και πραγματοποιείται καλή ανάμειξη των κυττάρων με χρήση πιπέτας, έτσι ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Μια ποσότητα από το εναιώρημα κυττάρων (συνήθως 1:5 – 1:10 ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις ανάγκες του πειράματος) μεταφέρεται σε νέα φλάσκα που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου είναι 5 ml για την φλάσκα T₂₅ και 15 ml για την φλάσκα T₇₅. Τα κύτταρα διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

3.2. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας πραγματοποιείται μετά από ψύξη-πάγωμα μέσα σε ειδικά σωληνάρια (cryovials) για χρονικά διαστήματα μερικών μηνών στους -80° C ή για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε υγρό άζωτο. Η μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων γίνεται σε κρυοπροστατευτικό μέσο το

οποίο αποτελείται από θρεπτικό υλικό και DMSO. Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητο τα κύτταρα να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα και γι'αυτό κατά γενικό κανόνα το πάγωμα πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80% της επιφάνειας της φλάσκας.

3.2.1. Πάγωμα κυττάρων

Για την ψύξη των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων από τη φλάσκα και γίνεται έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα PBS (5 ml για την T₂₅ και 10 ml για την T₇₅). Μετά την απομάκρυνση του PBS προστίθεται διάλυμα τρυψίνης και τα κύτταρα είτε τοποθετούνται για λίγα λεπτά στους 37 °C είτε παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να δράσει η τρυψίνη. Αφού αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας (με τη βοήθεια επιπλέον ανάδευσης με την πιπέτα ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα) προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αδρανοποιεί την τρυψίνη. Ακολουθεί καλή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε μείγμα παγώματος (freezing medium). Το μείγμα παγώματος περιέχει DMSO (10%) σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10% FBS. Τα παγωμένα κύτταρα (1-1.5 ml) μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια (cryovials), τα οποία τοποθετούνται αρχικά στους -20 °C (για 2 ώρες περίπου) και εν συνεχεία στους -80 °C, ώστε η ψύξη των κυττάρων να είναι σταδιακή. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Είναι σημαντικό σε κάθε cryovial να αναγράφεται το είδος της κυτταρικής σειράς, ο αριθμός περασμάτων και η ημερομηνία παγώματος.

3.2.2. Ξεπάγωμα κυττάρων

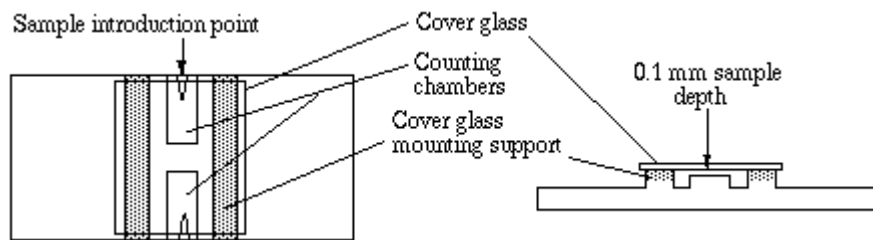
Το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα μεταφέρονται από τον καταψύκτη -80 °C είτε από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο 37 °C, όπου αποψύχονται με συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις. Έπειτα, μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό και αναδεύονται με χρήση πιπέτας, ώστε να αναμειχθούν πλήρως. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκες T₂₅ ή T₇₅

(ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων), οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DMSO που περιέχονται στο μείγμα παγώματος. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μετά το ξεπάγωμα και την μεταφορά σε σωληνάρια τύπου falcon μπορεί να φυγοκεντρηθούν και ακολούθως να επαναδιαλυθούν σε πλήρες θρεπτικό μέσο προτού μεταφερθούν σε νέα φλάσκα καλλιέργειας. Είναι σημαντικό στην επιφάνεια της φλάσκας να αναγράφεται ο αριθμός των περασμάτων της κάθε κυτταρικής σειράς.

4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου

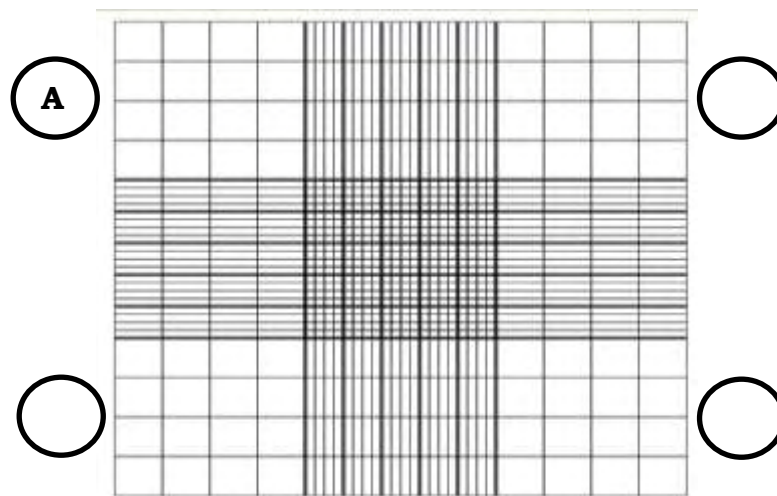
Για την διεξαγωγή του πειράματος απαιτείται η χρήση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων που θα τοποθετηθούν σε κατάλληλα τρυβλία καλλιέργειας. Η διαδικασία υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων ξεκινά με τρυψινοποίηση της κυτταρικής καλλιέργειας. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια προστίθενται διάλυμα τρυψίνης-EDTA και αφού ελεγχθεί η αποκόλληση των κυττάρων (μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο), προστίθενται στη φλάσκα θρεπτικό υλικό ώστε να αδρανοποιηθεί η τρυψίνη και ακολουθεί καλή ανάμειξη των κυττάρων ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 1.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται σε νέο θρεπτικό υλικό. Κατόπιν, 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρονται σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια (Εικόνα 10).



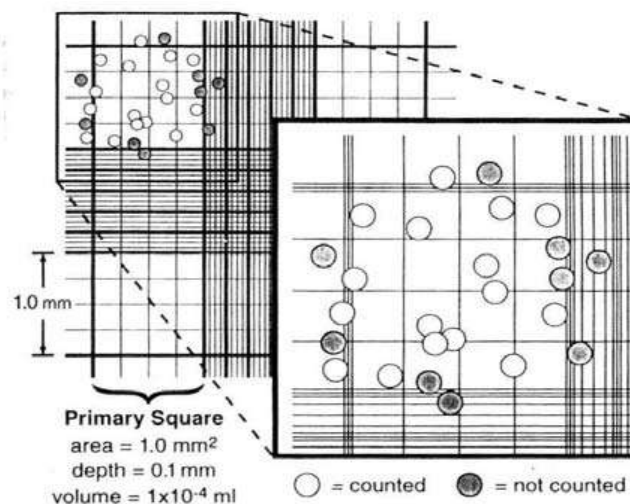
Εικόνα 10. Δομή του πλακιδίου Neubauer.

Κάθε μια από τις λείες επιφάνειες έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης, καθένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Ξεχωρίζουν, επιπλέον, τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα στα οποία γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Τα υπόλοιπα τετράγωνα σχηματίζουν ένα σταυρό και το σχήμα αυτό βοηθά στον εντοπισμό των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο βοηθά στη μέτρηση των κυττάρων.

Το μέτρημα των κυττάρων γίνεται ως εξής: μετρώνται όλα τα κύτταρα σε κάθε ένα από τα γωνιακά τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών (Εικόνα 12). Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων σε κύτταρα/ml είναι ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων επί 10^4 , δηλαδή $(A+B+Γ+Δ/4) \times 10^4$ κύτταρα/ml.



Εικόνα 12. Σχηματική παρουσίαση του τρόπου υπολογισμού των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

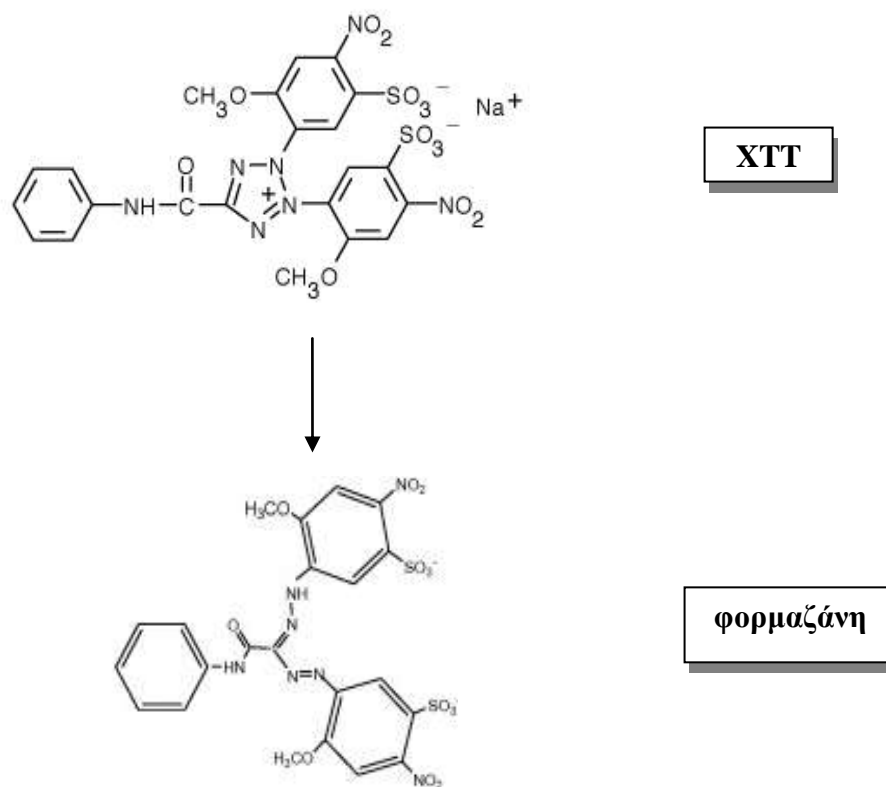
5. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

5.1. Αρχή της μεθόδου

Για τη μη-ραδιενεργή ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική μέθοδος, η οποία βασίζεται στο αντιδραστήριο XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxide). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το cell proliferation kit II της εταιρείας Roche.

Το XTT συντέθηκε το 1988 από τον Paull και τους συναδέλφους του (*Paull et al., 1988*) και η μέθοδος περιγράφηκε πρώτα από τους Scudiero et al (*Scudiero et al., 1988*) και βελτιώθηκε μέσα στα επόμενα χρόνια από άλλους ερευνητές. Βασίζεται στην ικανότητα διάσπασης του κίτρινου άλατος τετραζολίου XTT και στο σχηματισμό της φορμαζάνης, που είναι μια πορτοκαλί υδατοδιαλυτής χρωστικής (Εικόνα 13). Το πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν άλλα άλατα του τετραζολίου (π.χ. MTT) είναι ακριβώς το γεγονός ότι η διάσπαση του XTT δίνει μια υδατοδιαλυτή ένωση και έτσι δεν απαιτείται το βήμα της διαλυτοποίησης. Επιπλέον, πρόκειται για μια μέθοδο με υψηλή ευαισθησία, καθώς μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και μικρός αριθμός κυττάρων. Η μέθοδος XTT βρίσκει εφαρμογή στην εξέταση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες ή θρεπτικές ουσίες, αλλά και στη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας.

Η αντίδραση πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά και συνεπώς ζωντανά κύτταρα και καταλύεται από μία ομάδα ενζύμων, τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες. Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων συνεπάγεται αύξηση της ολικής δραστηριότητας των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στο δείγμα. Αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται. Η χρωστική φορμαζάνη μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο (ELISA reader). Αυτό διασφαλίζει μεγάλο βαθμό ακρίβειας και άμεση επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή και συνεπώς καθίσταται δυνατός ο γρήγορος και εύκολος χειρισμός μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



Εικόνα 13. Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό άλας φορμαζάνης.

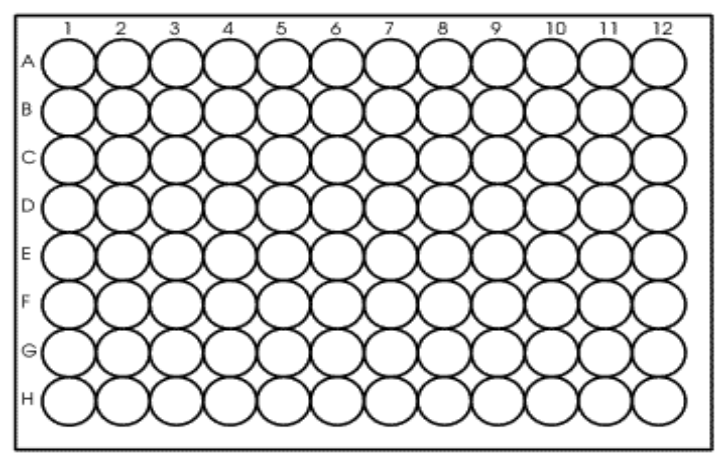
5.2. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο XTT διαρκεί 4 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε τρυβλίο 96-θέσεων (96-well plate). Την δεύτερη ημέρα ξεκινάει η επώαση των κυττάρων με τα εξεταζόμενα φυτικά

εκχυλίσματα και μετά από 48 ώρες (την τέταρτη ημέρα) προστίθεται το αντιδραστήριο XTT και ακολουθεί φωτομέτρηση για την εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Την πρώτη ημέρα του πειράματος πραγματοποιείται η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων, ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί προηγουμένως ένα πείραμα τιτλοδότησης, στο οποίο μελετάται η ανάπτυξη διαφορετικού αριθμού κυττάρων, σε συνδυασμό με διαφορετικές ώρες επώασης με το αντιδραστήριο XTT. Επιλέγεται ο συνδυασμός του αριθμού κυττάρων και του χρόνου επώασης με το αντιδραστήριο XTT, στον οποίο παρατηρείται γραμμική ανάπτυξη των κυττάρων. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διαθέτουν ένα καλό μεταβολικό ρυθμό, κάτι που συνήθως παρατηρείται όταν καλύπτουν ομοιόμορφα το 40-60% του πιάτου καλλιέργειας.

Λόγω της διαφορετικής μορφολογίας των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα κυττάρων για την επίστρωση του τρυβλίου 96 θέσεων ανάλογα με την κυτταρική σειρά (Εικόνα 14). Συγκεκριμένα, για κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν 15.000 κύτταρα/πηγαδάκι, για κύτταρα MCF-7, χρησιμοποιήθηκαν 20.000 κύτταρα/πηγαδάκι και για κύτταρα HepG2 35.000 κύτταρα/πηγαδάκι. Μετά από την τρυψινοποίηση των κυττάρων και τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων/ml, υπολογίζεται ο όγκος που περιέχει τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων (όπως προαναφέρθηκε), στα οποία προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM, αντιβιοτικά, 10% FBS) σε τελικό όγκο 150 μ l. Τα κύτταρα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του τρυβλίου 96 θέσεων και επωάζονται στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ μέχρι την επόμενη μέρα, προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας.



Εικόνα 14. Τρυβλίο 96 θέσεων

Την δεύτερη ημέρα πραγματοποιείται η προσθήκη των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στα κύτταρα. Για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται μείγμα, το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία ορού, με αντιβιοτικά και το εκχύλισμα σε συνολικό όγκο 100 μ l. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν την κλασμάτωση είχαν τελική συγκέντρωση 20 mg/ml, ενώ μετά την κλασμάτωση τα εκχυλίσματα είτε συμπυκνώθηκαν, είτε αραιώθηκαν (ανάλογα με το εκχύλισμα) και χρησιμοποιήθηκαν στην ίδια τελική συγκέντρωση. Αρχικά απομακρύνεται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό από το κάθε πηγαδάκι και προστίθενται στα κύτταρα 100 μ l από το κάθε δείγμα. Επιπλέον, κάθε πείραμα περιελάμβανε και τα ακόλουθα δείγματα: α) δείγματα control, δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία DMEM και αντιβιοτικών, απουσία ορού και εκχυλισμάτων (τουλάχιστον εις τριπλούν), β) δείγμα «θετικού ελέγχου», δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία του αντικαρκινικού φαρμάκου ετοποσίδη σε τελική συγκέντρωση 100 μ M (όπου αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος), γ) δείγματα που περιέχουν τις συγκεκριμένες ποσότητες εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία κυττάρων. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται ώστε να εκτιμηθεί η απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα εξεταζόμενα μήκη κύματος. Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, όπου τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Roche, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Αρχικά πραγματοποιείται η προσθήκη 50 μ l από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου 96-θέσεων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B που περιέχονται

στο kit. Αναλυτικά, το αντιδραστήριο A καλείται XTT labeling reagent και περιέχει 1mg/ml XTT {sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} σε θρεπτικό RPMI 1640, ενώ το αντιδραστήριο B καλείται electron-coupling reagent και περιέχει 0,383 mg/ml PMS (N-methyldibenzopyrazinemethylsulfate) σε αποστειρωμένο PBS. Τα αντιδραστήρια A και B αναμειγνύονται στην αναλογία που προαναφέρθηκε (50:1) λίγο πριν από τη χρήση τους. Κατόπιν, ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το αντιδραστήριο XTT στους 37 °C για 4 ώρες και φωτομέτρηση στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).

6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.

Μετά τη διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιείται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με σκοπό τον υπολογισμό του ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης που προκαλούν τα εκχυλίσματα σε κάθε κυτταρική σειρά. Με βάση τις τιμές της απορρόφησης που λαμβάνονται από τη φωτομέτρηση (στα 450 και 630 nm), πραγματοποιούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:

OD_{control}: τιμή απορρόφησης του δείγματος ελέγχου, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα, απουσία εκχυλίσματος.

OD_{δείγματος}: τιμή απορρόφησης των υπό εξέταση δειγμάτων, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που περιέχουν κύτταρα παρουσία εκχυλίσματος.

OD_{εκχυλίσματος}: τιμή απορρόφησης του κάθε εκχυλίσματος, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 450 και 630 nm στα δείγματα που επώαστηκαν με την συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος, απουσία κυττάρων.

Τελικά, το επί της εκατό (%) ποσοστό αναστολής των κυττάρων υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{\text{O.D. (control)} - [(\text{O.D. (δείγματος)} - \text{O.D. (εκχυλίσματος)})]}{\text{O.D. (control)}} \times 100$$

Στη συνέχεια, τα % ποσοστά αναστολής των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση, με τη

βοήθεια της μεθόδου Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent Student's t-test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

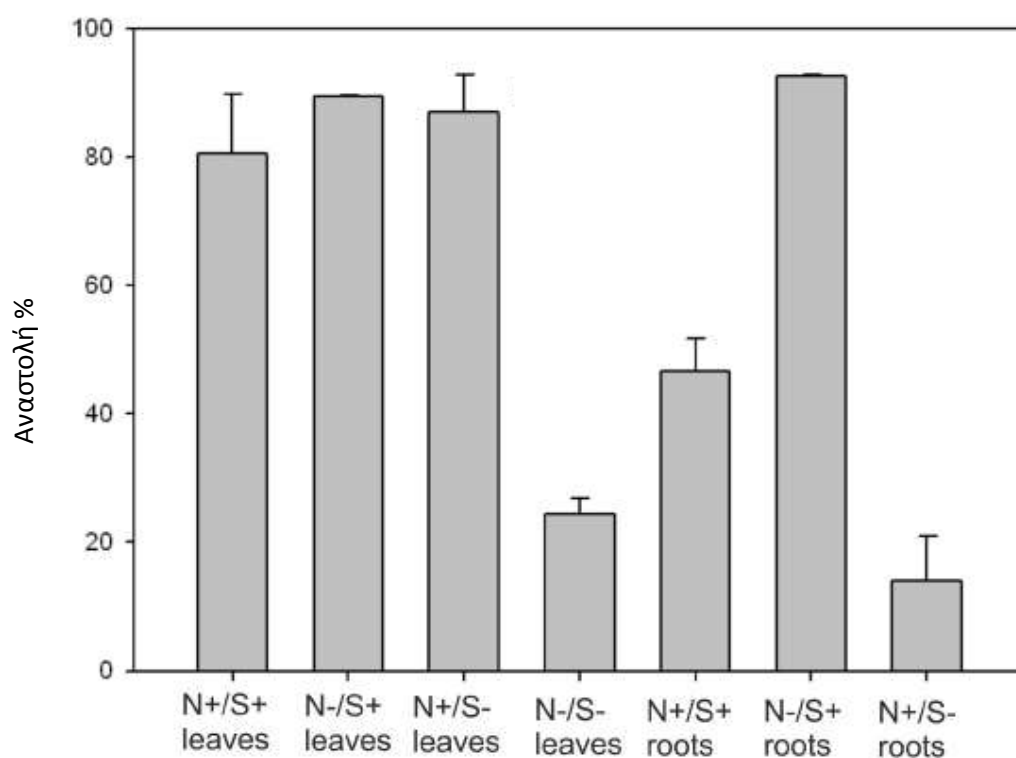
Το φυτό ρόκα (*Eruca sativa*) αναπτύχθηκε με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους, όσον αφορά την περιεκτικότητα θειικής και αζωτούχας λίπανσης. Αναλυτικά, στην πρώτη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση που ήταν πλήρης σε άζωτο και θείο (N+/S+), στην δεύτερη λίπανση με πλήρη θείο αλλά μειωμένο άζωτο (N-/S+), στην τρίτη λίπανση με πλήρη άζωτο αλλά μειωμένο θείο (N+/S-), και στην τέταρτη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση με μειωμένο άζωτο και θείο (N-/S-). Μετά από κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκε εκχύλιση από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα φυτά μετά από μεταχείριση με μειωμένο άζωτο και θείο εμφάνισαν περιορισμένη ανάπτυξη. Για τον λόγο αυτό ήταν δυνατό να απομονωθεί αρκετή ποσότητα εκχυλίσματος για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας μόνο από τα φύλλα των φυτών αυτών, αλλά όχι από τις ρίζες τους (*Κατσαρού, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα*). Αναμένεται ότι οι διαφορές στην λίπανση θα επηρεάσουν τη σύσταση των γλυκοσινολικών οξέων στα διαφορετικά αυτά τμήματα του φυτού. Οι διαφορές αυτές αναμένεται να επιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών HepG2, MCF-7 και HeLa, δηλαδή ηπατοκαρκινώματος, αδενοκαρκινώματος μαστού και ενδομητρίου αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επιπλέον κλασμάτωση των εκχυλισμάτων, με σκοπό την περαιτέρω καθαρισμό τους και τον εμπλουτισμό τους σε γλυκοσινολικά οξέα. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετική στήλη Sephadex για το κάθε εκχύλισμα, και πραγματοποιήθηκαν 4 εκλούσεις με τα ακόλουθα διαλύματα: 1) νερό, 2) μεθανόλη, 3) διάλυμα νιτρικού καλίου και 4) διάλυμα θειικού καλίου. Με βάση προηγούμενες μελέτες αναμένεται ότι τα γλυκοσινολικά οξέα απομονώνονται μετά από την έκλυση παρουσία θειϊκών αλάτων (*Barillari et al., 2001*).

1. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 επηρεάζεται από τα εκχυλίσματα που προέρχονται τόσο από τα φύλλα όσο και από τις ρίζες μετά τις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Τα εκχυλίσματα των φύλλων ανέστειλαν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα των φύλλων, μετά από τις μεταχειρίσεις N+/S+, N-/S+ και N+/S- έδειξαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστά 80% έως 90%. Μόνο η μεταχείριση N-/S-

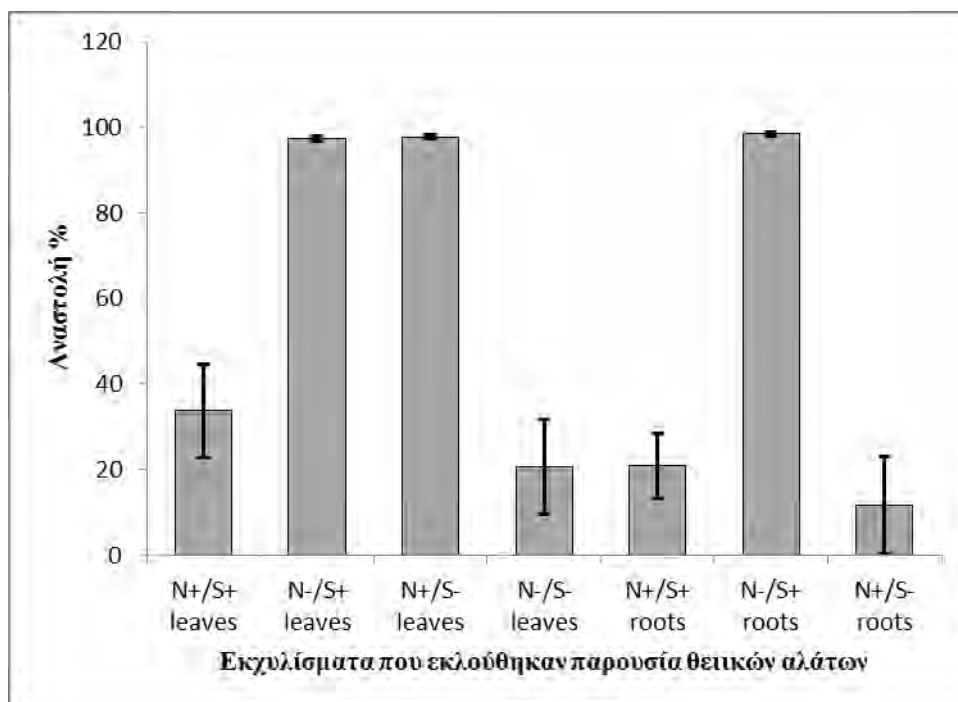
προκάλεσε το μικρότερο ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (25%). Επίσης, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 από τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις ρίζες μετά τις διάφορες μεταχειρίσεις. Αναλυτικά, η μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 (ποσοστό 90%) πραγματοποιήθηκε μετά από την μεταχείριση N-/S+. Η κανονική λίπανση (N+/S+) ανέστειλε σε ποσοστό περίπου 50% την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, ενώ τα εκχυλίσματα των ριζών μετά από μεταχείριση N+/S- ανέστειλαν την κυτταρική ανάπτυξη σε ποσοστό 10% (Γράφημα 1).



Γράφημα 1. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

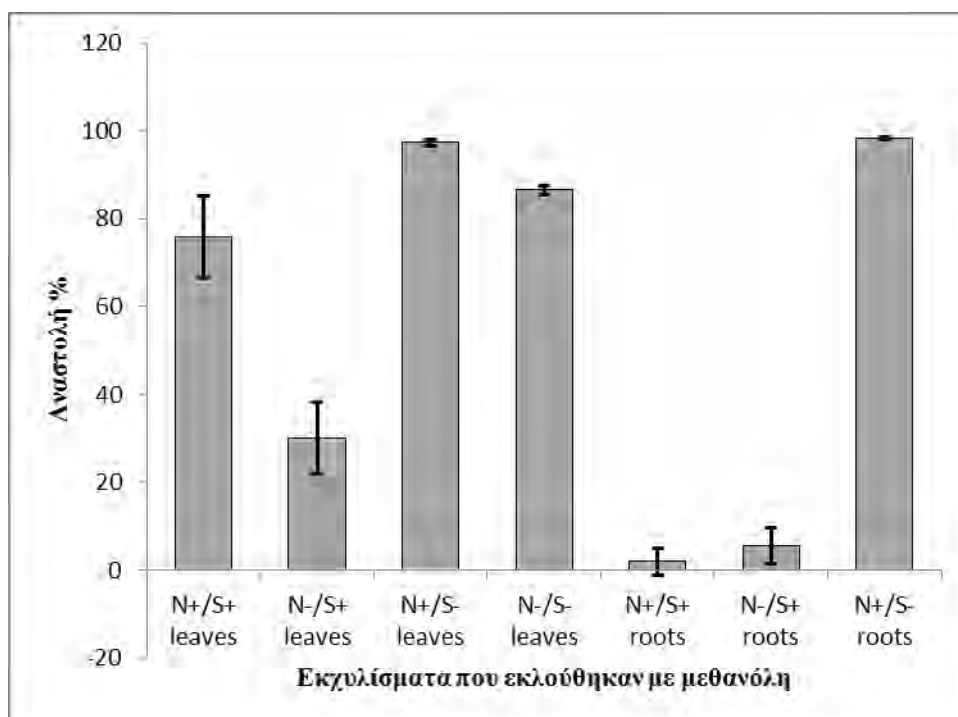
Στην παρούσα εργασία κύτταρα HepG2 επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα μετά από την έκλουσή τους με θειικά άλατα και εκτιμήθηκε η επίδρασή τους στην κυτταρική ανάπτυξη. Παρατηρήθηκε μεγάλη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+ και N+/S-, με ποσοστά 97,5% και 97,8% αντίστοιχα. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+ και N-/S-, με ποσοστά 33,8% ($P=0,08$) και 20,5% ($P=0,2$), τα οποία είναι μη στατιστικά σημαντικά.

Το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής (98,5%) της κυτταρικής ανάπτυξης παρατηρήθηκε μετά από επώαση με το εκχύλισμα που προέρχεται από τις ρίζες της μεταχείρισης N-/S+. Τα εκχυλίσματα ριζών μετά από μεταχειρίσεις N+/S+ και N+/S- ανέστειλαν σε μικρό (μη στατιστικά σημαντικό βαθμό) την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Συγκεκριμένα τα ποσοστά αναστολής των εκχυλισμάτων αυτών ήταν 20,8% ($P=0,15$) και 11,8% ($P=0,27$) αντίστοιχα (Γράφημα 2).



Γράφημα 2. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τα εκχυλίσματα που εκλούθηκαν παρουσία θεικών αλάτων

Τα αποτελέσματα του Γραφήματος 2 συμφωνούν (σε μεγάλο βαθμό) με τα αποτελέσματα του Γραφήματος 1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κλασμάτωση των εκχυλισμάτων μέσω της στήλης πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και οδήγησε στον εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων. Όμως, υπήρξαν κάποια εκχυλίσματα (ενδεικτικά τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+, N-/S-), για τα οποία δεν φαίνεται να υπάρχει συμφωνία, μεταξύ των αποτελεσμάτων που προήλθαν από το αρχικό εκχύλισμα και των αποτελεσμάτων που προήλθαν από το εκχύλισμα μετά την έκλυση με τα θειικά άλατα. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν και τα εκχυλίσματα που απομονώθηκαν μετά από έκλυση της στήλης με μεθανόλη, τα οποία παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.



Γράφημα 3. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από τα εκχυλίσματα που εκλούθησαν με μεθανόλη

Η μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 προήλθε μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+, N+/S- και N-/S-, με ποσοστά αναστολής 75,8%, 97,3% και 86,5% αντίστοιχα, καθώς και από το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S-, με ποσοστό αναστολής 98% (Γράφημα 3). Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης προκάλεσε το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N-/S+ (ποσοστό αναστολής 30%), ενώ τα εκχυλίσματα των ριζών των μεταχειρίσεων N+/S+, N-/S+ εμφάνισαν μια τάση (πολύ μικρή αναστολή, μη στατιστικά σημαντική) αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης, με ποσοστά αναστολής 2% ($P=0,7$) και 5,6% ($P=0,3$) αντίστοιχα.

Από την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων HepG2 πριν και μετά τον καθαρισμό τους από την στήλη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

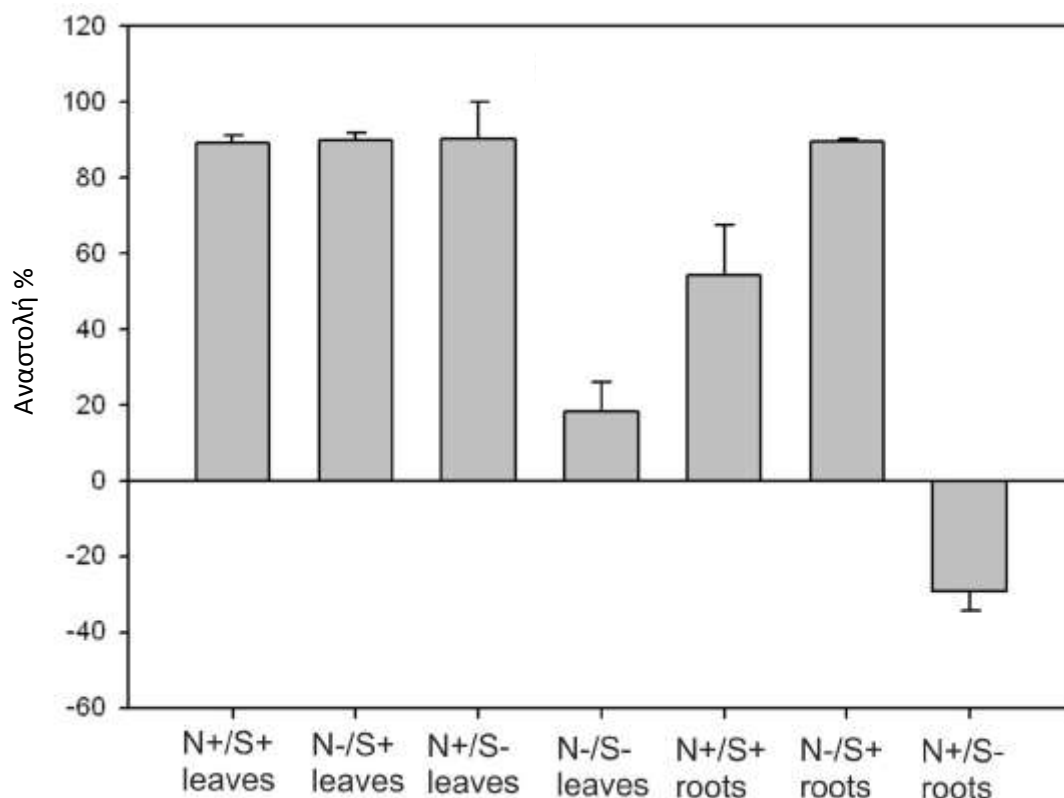
1) Τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+, N+/S- και το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+ εμπλουτίζονται μετά από την κλασμάτωσή τους παρουσία θεικών αλάτων. Η επώαση των κυττάρων HepG2 με τα ανωτέρω εκχυλίσματα οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης τους, με ποσοστά αναστολής λίγο

μεγαλύτερα (περίπου 98%) από εκείνα που προέκυψαν από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα, πριν από τον καθαρισμό τους στη στήλη. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η κλασμάτωση των εκχυλισμάτων με χρήση της στήλης Sephadex παρουσία θεικών αλάτων οδήγησε στον καθαρισμό και εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων αυτών σε γλυκοσινολικά οξέα.

2) Τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+ και N-/S-, τα οποία πριν από την κλασμάτωση στη στήλη προκαλούσαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστά 90% και 50% αντίστοιχα (Γράφημα 1), εμφανίζουν μικρή δραστικότητα μετά το πέρασμα τους από την στήλη και την έκλουσή τους με θειικά άλατα (ποσοστά αναστολής 35% και 20% αντίστοιχα) (Γράφημα 2). Όμως, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σημαντικός βαθμός δραστικότητας παρατηρείται στα κλάσματα αυτών που εκλούθηκαν με μεθανόλη (Γράφημα 3). Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι πιθανώς να υπήρξε κάποιο «πειραματικό λάθος» κατά την διαδικασία κατασκευής της στήλης Sephadex, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να επιτευχθεί η κλασμάτωση των εκχυλισμάτων και η έκλουσή τους παρουσία θεικών αλάτων (όπως αναμενόταν) αλλά παρουσία μεθανόλης.

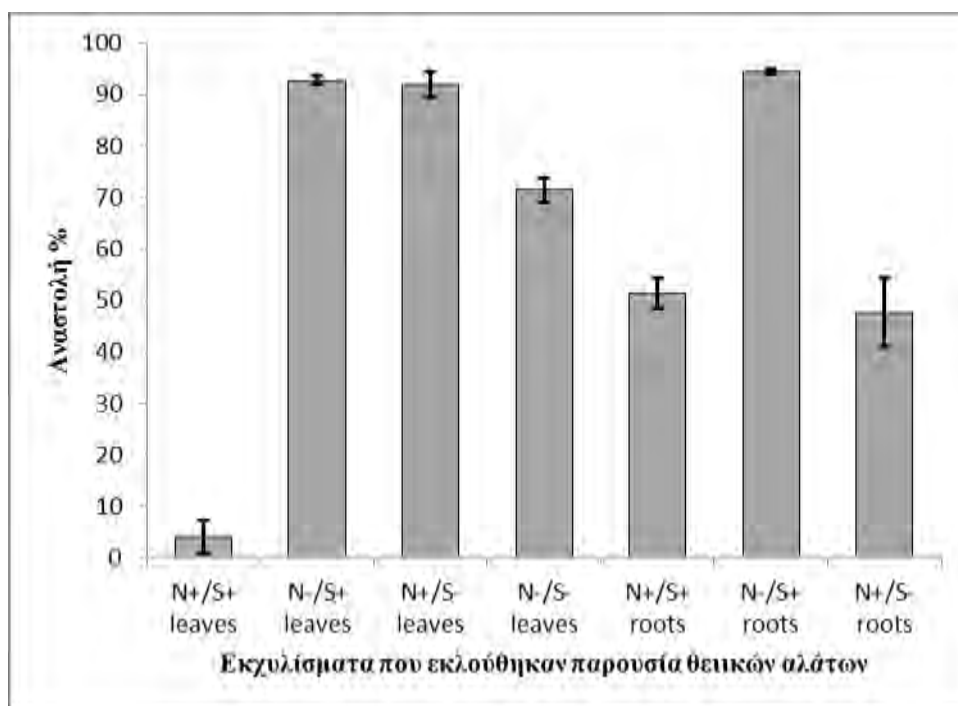
2. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 επηρεάζεται από τα εκχυλίσματα που προέρχονται τόσο από τα φύλλα όσο και από τις ρίζες μετά τις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Αναλυτικά, τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S+, N-/S+ και N+/S- προκαλούν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε πολύ υψηλά ποσοστά (περίπου 90%). Αντιθέτως, το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N-/S- προκάλεσε πολύ μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό περίπου 20%) (Γράφημα 4). Σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα των φύλλων, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις ρίζες μετά τις διάφορες μεταχειρίσεις. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετά από τη μεταχείριση N-/S+ (ποσοστό 90%), ενώ μικρότερη αναστολή (ποσοστό περίπου 55%) παρατηρήθηκε από το εκχύλισμα ριζών μετά από κανονική λίπανση (N+/S+). Ενδιαφέρον παρουσίασε το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης N+/S-, το οποίο δεν ανέστειλε, αλλά προκάλεσε ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, σε ποσοστό περίπου 30% (Γράφημα 4).



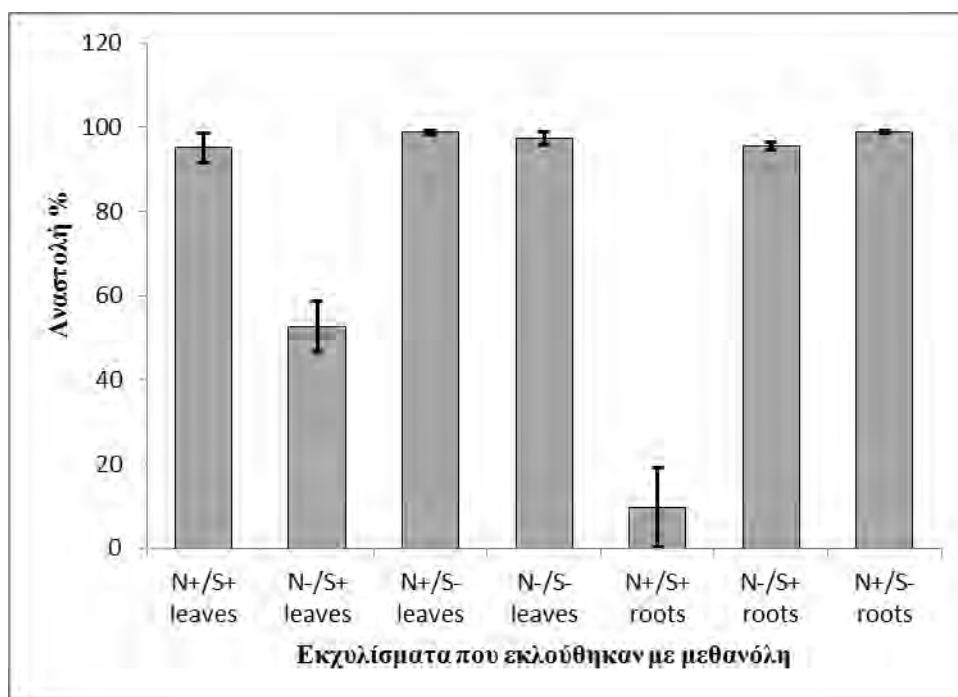
Γράφημα 4. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF7 από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Ακολουθώντας, μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που εκλούθησαν από την στήλη παρουσία θεικών αλάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 (Γράφημα 5). Σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 επιτυγχάνεται μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα φύλλων των μεταχειρίσεων N-/S+, N+/S- και N-/S-, με ποσοστά αναστολής 92,7%, 91,9% και 71,5% αντίστοιχα. Το εκχύλισμα φύλλων μετά από μεταχείριση N+/S+ εμφάνισε μια μικρή τάση αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 4,2%, $P=0,411$). Επίσης, τα εκχυλίσματα των ριζών προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, αλλά υπήρξαν διαφορές ανάλογα με την μεταχείριση. Αναλυτικά, η μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης παρατηρήθηκε από τα εκχυλίσματα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+ (με ποσοστό 94,4%), ενώ τα εκχυλίσματα των μεταχειρίσεων N+/S+ και N+/S- ανέστειλαν την ανάπτυξη σε παρόμοιο βαθμό (ποσοστά 51,4% και 47,6% αντίστοιχα) (Γράφημα 5).



Γράφημα 5. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από εκχυλίσματα που εκλούθησαν παρουσία θεικών αλάτων

Στη συνέχεια εξετάστηκε και η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων που εκλούθησαν με μεθανόλη στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 (Γράφημα 6). Σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 παρατηρήθηκε όταν επώασθηκαν με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φύλλα των μεταχειρίσεων N+/S+, N+/S- και N-/S- με ποσοστά αναστολής 95,1%, 99% και 98,8% αντίστοιχα. Το εκχύλισμα που προέρχεται από τα φύλλα μετά από μεταχείριση N-/S+ ανέστειλε σε μικρότερο ποσοστό την ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 (52,5%). Εξίσου σημαντικά ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 παρατηρήθηκαν και από τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις ρίζες. Τα εκχυλίσματα ριζών μετά από τις μεταχειρίσεις N-/S+ και N+/S- ανέστειλαν την ανάπτυξη των κυττάρων σε ποσοστό 95,1% και 97,4% αντίστοιχα, ενώ το εκχύλισμα ριζών μετά από μεταχείριση με κανονική λίπανση (N+/S+) εμφάνισε τάση αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 9,8%, $P=0,4157$).



Γράφημα 6. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τα εκχυλίσματα που εκλούθηκαν με μεθανόλη

Από την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων MCF-7 πριν και μετά τον καθαρισμό τους από την στήλη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

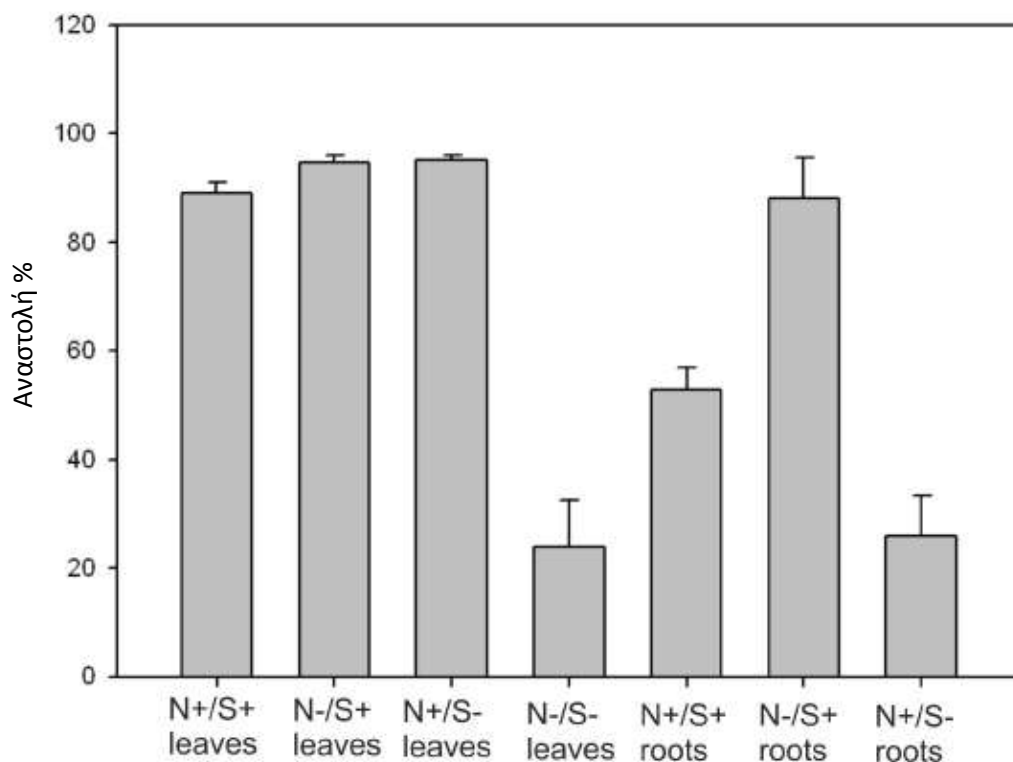
- 1) Τα εκχυλίσματα των φύλλων μετά από τις μεταχειρίσεις N-/S+, N+/S-, N-/S- και του εκχυλίσματος που προέρχεται από τις ρίζες της μεταχείρισης N-/S+ εμπλουτίζονται μετά από την κλασμάτωσή τους και την έκλουση παρουσίαθειικών αλάτων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό αναστολής των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων είτε αυξάνεται σημαντικά είτε παραμένει σε υψηλά επίπεδα (70-90%), σε σχέση με το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης πριν από την κλασμάτωση. Αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία της κλασμάτωσης οδήγησε στον καθαρισμό και εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων αυτών σε γλυκοσινολικά οξέα.
- 2) Το εκχύλισμα φύλλων μετά από μεταχείριση υπό κανονικές συνθήκες αζώτου και θείου (N+/S+) πριν από την κλασμάτωσή του προκαλεί μεγάλη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 90%) (Γράφημα 4), ενώ μετά την κλασμάτωση και την έκλουση μεθειικά άλατα προκαλεί πολύ μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (Γράφημα 5). Όμως, υψηλή δραστηριότητα και ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7 παρατηρείται από το εκχύλισμα αυτό, μετά την έκλουση με μεθανόλη (ποσοστό 95%) (Γράφημα 6). Ανάλογο φαινόμενο

παρατηρήθηκε όταν το συγκεκριμένο εκχύλισμα χορηγήθηκε σε κύτταρα HepG2, όπως προαναφέρθηκε. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς να υπήρξε κάποιο «πειραματικό λάθος» κατά την διαδικασία κατασκευής της στήλης Sephadex, με αποτέλεσμα τα γλυκοσινολικά οξέα να κλασματούνονται μετά την έκλυση με μεθανόλη αλλά όχι παρουσία θεικών αλάτων.

3) Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μετά την κλασμάτωση παρουσία θεικών αλάτων, η ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 αναστέλλεται (με ποσοστό περίπου 48%) από το εκχύλισμα που προέρχεται από τις ρίζες μετά από την μεταχείριση N+/S- (Γράφημα 5), ενώ σε προηγούμενες μελέτες το εκχύλισμα αυτό εμφάνισε ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης (περίπου 30%) (Γράφημα 4). Φαίνεται ότι η κλασμάτωση του εκχυλίσματος αυτού προκάλεσε μεγάλη αλλαγή στη δραστηριότητα του. Το εκχύλισμα αυτό είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε ινδολικά σε σύγκριση με αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα (*Κατσαρού, Ομήρου κ.α, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα*). Είναι πιθανόν μετά την κλασμάτωση, και εξαιτίας της διαφορετικής περιεκτικότητας σε θείο των ινδολικών και αλειφατικών ενώσεων, να έχει απολεσθεί η αυξημένη συγκριτικά συγκέντρωση των ινδολικών γλυκοσινολικών και αυτό να σχετίζεται με την τροποποίηση της δραστηριότητας του εκχυλίσματος.

3. Επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό (ποσοστά αναστολής από 90-97%) μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των φύλλων που προήλθαν από τις μεταχειρίσεις N+/S+, N-/S+ και N+/S-, αλλά μόνο σε πολύ μικρό βαθμό από τα εκχυλίσματα των φύλλων της μεταχείρισης N-/S- (ποσοστό αναστολής 25%). Επίσης, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa όταν επώαστηκαν με τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τις ρίζες των φυτών μετά από τις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Αναλυτικά, η μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa (ποσοστό 85%) εμφανίστηκε από τα εκχυλίσματα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+. Τα εκχυλίσματα των ριζών μετά από κανονική λίπανση (N+/S+) ανέστειλαν σε ποσοστό 50% την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa, ενώ τα εκχυλίσματα μετά από μεταχείριση N+/S- ανέστειλαν την κυτταρική ανάπτυξη σε ποσοστό περίπου 25% (Γράφημα 7).

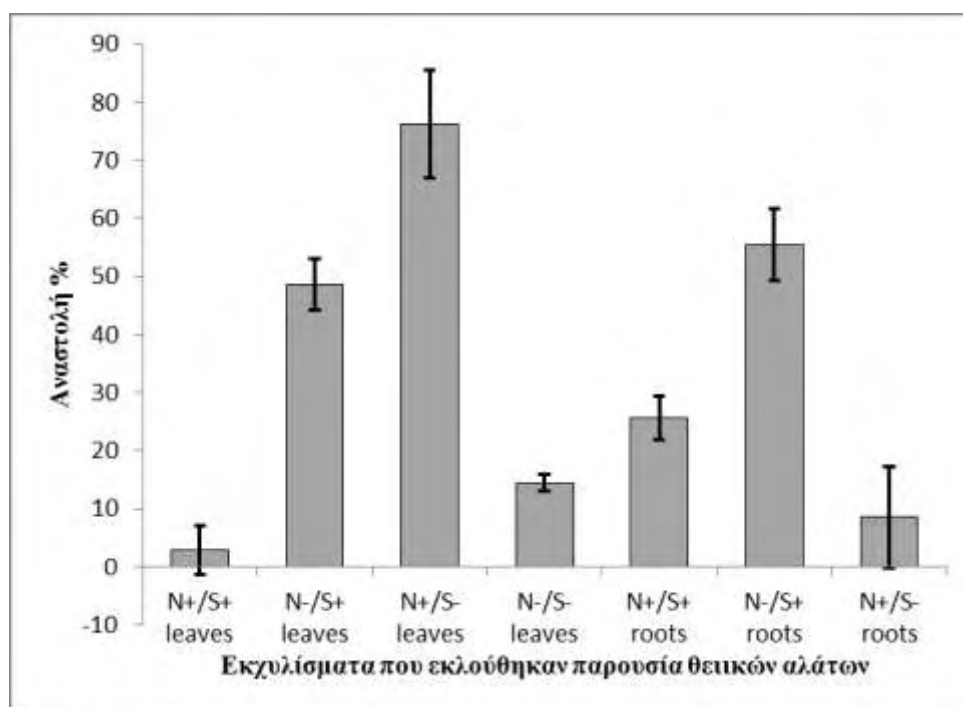


Γράφημα 7. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που εκλούθησαν παρουσία θεικών αλάτων στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa. Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa αναστέλλεται από τα εκχυλίσματα των φύλλων μετά από τις μεταχειρίσεις N-/S+ και N+/S-, με ποσοστά αναστολής 48,6% και 76,2% αντίστοιχα. Το εκχύλισμα των φύλλων μετά από μεταχείριση N-/S- ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa σε μικρό ποσοστό (14,4%) ($P=0,018$). Αντιθέτως, το εκχύλισμα των φύλλων υπό μεταχείριση κανονικού αζώτου και θείου (N+/S+) εμφανίζει μια τάση αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων (ποσοστό αναστολής 2,92%, το οποίο δεν είναι στατιστικά σημαντικό, $P=0,555$) (Γράφημα 8).

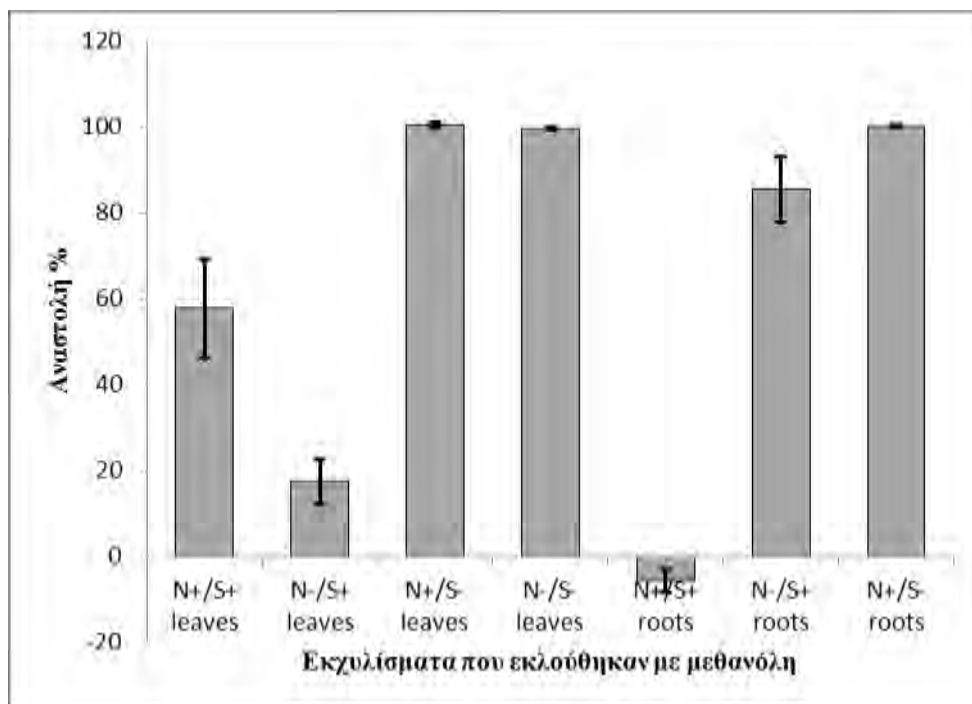
Η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa επηρεάζεται μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα των ριζών, σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την μεταχείριση. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N-/S+ ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων στο μεγαλύτερο ποσοστό (55,4%) συγκριτικά με τα άλλα εκχυλίσματα. Το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S+ προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστό 25,5%, ενώ το εκχύλισμα της μεταχείρισης

N+/S- προκάλεσε μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, η οποία ήταν μη στατιστικά σημαντική (ποσοστό 8,6%, $P=0,412$) (Γράφημα 8).



Γράφημα 8. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από εκχυλίσματα που εκλούθηκαν παρουσία θεικών αλάτων

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση των κλασμάτων που εκλούθηκαν με μεθανόλη στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa (Γράφημα 9). Παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης από τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N+/S- και N-/S- με ποσοστά 99,6% και 100% αντίστοιχα. Επιπλέον, το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N+/S+ ανέστειλε σε ποσοστό 58% την ανάπτυξη των κυττάρων HeLa. Τέλος, το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N-/S+ προκάλεσε μικρή αναστολή (ποσοστό 17,5%, μη στατιστικά σημαντικό, $P=0,0677$) της κυτταρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, υψηλό ποσοστό αναστολής παρατηρήθηκε από τα εκχυλίσματα των ριζών των μεταχειρίσεων N-/S+ και N+/S-, σε ποσοστό 85,5% και 100% αντίστοιχα. Τέλος, το εκχύλισμα των ριζών που μεταχειρίστηκε υπό κανονικές συνθήκες αζώτου και θείου (N+/S+) εμφανίζει μια μικρή τάση ενίσχυσης της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 5,8%, μη στατιστικά σημαντικό ($P=0,0673$)).



Γράφημα 9. Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από εκχυλίσματα που εκλούθηκαν με μεθανόλη

Από την μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη κυττάρων HeLa πριν και μετά τον καθαρισμό τους από την στήλη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1) Τα εκχυλίσματα των φύλλων μετά από τις μεταχειρίσεις N-/S+, N+/S- και το εκχύλισμα που προέρχεται από τις ρίζες της μεταχείρισης N-/S+ παρουσιάζουν σημαντικά ποσοστά αναστολής (50-76%) μετά την κλασμάτωση παρουσία θεικών αλάτων (Γράφημα 8), τα οποία ωστόσο δεν υπερβαίνουν τα ποσοστά αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης πριν από την κλασμάτωση (Γράφημα 7). Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται και το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S+. Τα εκχυλίσματα αυτά, παρόλο που δεν φαίνεται να εμπλουτίζονται μετά από την κλασμάτωσή τους και την έκλυση παρουσία θεικών αλάτων, εντούτοις διατηρούν την ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa.

2) Το εκχύλισμα φύλλων μετά από μεταχείριση υπό κανονικές συνθήκες αζώτου και θείου (N+/S+) πριν από την κλασμάτωσή του προκαλεί μεγάλη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (ποσοστό 90%) (Γράφημα 7), ενώ μετά την κλασμάτωση και την έκλυση με θειικά άλατα προκαλεί πολύ μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (Γράφημα 8). Όμως σημαντική ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa παρατηρείται από το εκχύλισμα αυτό, μετά την έκλυση με

μεθανόλη (ποσοστό 58%) (Γράφημα 9). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν το συγκεκριμένο εκχύλισμα χορηγήθηκε σε κύτταρα MCF-7 και HepG2, όπως προαναφέρθηκε. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανώς να υπήρξε κάποιο «πειραματικό λάθος» κατά την διαδικασία κατασκευής της στήλης Sephadex, με αποτέλεσμα τα γλυκοσινολικά οξέα να κλασματώνονται μετά την έκλυση με μεθανόλη αλλά όχι παρουσία θεικών αλάτων.

3) Τέλος, το εκχύλισμα των φύλλων απουσία αζώτου και θείου (N-/S-) και το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S- προκαλούν μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa τόσο πριν (25%) όσο και μετά την κλασμάτωση (8-15%) και την έκλυση με θειικά άλατα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι διατηρείται υψηλό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης μετά την έκλυση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων παρουσία μεθανόλης (Γράφημα 9).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός μελετών που αναδεικνύουν την αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων. Επιπλέον, προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου «Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος» έδειξαν ότι εκχυλίσματα ρόκας, που προέρχονται από τα φύλλα και από τις ρίζες του φυτού, κάτω από διαφορετικές συνθήκες θεικής και αζωτούχας λίπανσης, έχουν διαφορετική σύσταση και συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων (Παράρτημα Α) και επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (*Κατσαρού, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα*). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση της κλασμάτωσης στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa, MCF-7 και HepG2.

Η λίπανση επιδρά στη σύσταση των εκχυλισμάτων στα διαφορετικά μέρη του φυτού (φύλλα και ρίζες) και η επίδραση αυτή αντικατοπτρίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η ανάπτυξη όλων των καρκινικών κυττάρων που μελετήθηκαν αναστέλλεται τόσο από τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα φύλλα του φυτού, όσο και από εκείνα που προέρχονται από τις ρίζες, αλλά σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το εκχύλισμα. Η διαφορά στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων πιθανώς να αντικατοπτρίζει τις διαφορές στο περιεχόμενο (συγκέντρωση και σύσταση) των ιστών σε γλυκοσινολικά οξέα (Παράρτημα Α).

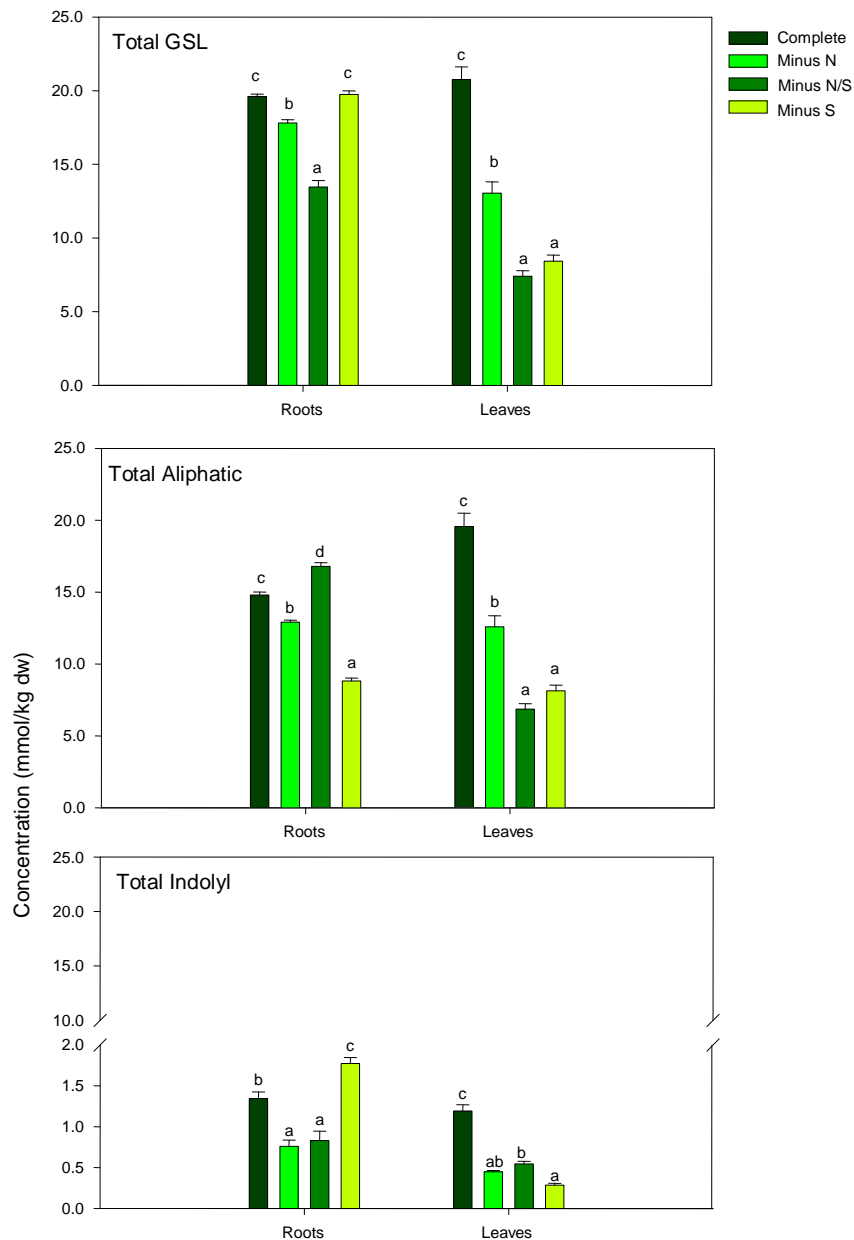
Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των εκχυλισμάτων που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ικανοποιητικός. Για τα περισσότερα εκχυλίσματα παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, τα οποία ήταν σε παρόμοια ποσοστά ή και μεγαλύτερα από εκείνα που προέκυψαν από πειράματα που διεξήχθησαν πριν τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Αυτό σημαίνει πως ο εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων με γλυκοσινολικά οξέα ενίσχυσε την αντικαρκινική τους δράση. Η μόνη εξαίρεση αφορά το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης N+/S-, το οποίο είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένο σε ινδολικά σε σύγκριση με αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα (Παράρτημα Α). Το εκχύλισμα αυτό πριν τον καθαρισμό του προκαλούσε ενίσχυση της ανάπτυξης των κυττάρων MCF-7, αντιθέτως μετά τον καθαρισμό του προκάλεσε μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Είναι γνωστή η δράση των γλυκοσινολικών οξέων στην τροποποίηση του μεταβολισμού των στεροειδών ορμονών (*Srinibas et al., 2000*), και έχει αναφερθεί

ότι ορισμένοι μεταβολίτες ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων προκαλούν επαγωγή της καρκινογένεσης (πιθανώς μέσω της ικανότητάς τους να οξειδώνουν ανενεργούς πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες σε προϊόντα με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA) (*Baird et al., 2005*). Είναι πιθανόν μετά την κλασμάτωση, και εξαιτίας της διαφορετικής περιεκτικότητας σε θείο των ινδολικών και αλειφατικών ενώσεων, να έχει απολεσθεί η αυξημένη συγκριτικά συγκέντρωση των ινδολικών γλυκοσινολικών και αυτό να σχετίζεται με την τροποποίηση της δραστηρότητας του εκχυλίσματος, κυρίως στα ορμονοεξαρτώμενα κύτταρα MCF-7.

Με την παρούσα εργασία αναδεικνύονται οι προστατευτικές ιδιότητες της ρόκας απέναντι στον καρκίνο και κατά συνέπεια η σημασία της ως συστατικό της μεσογειακής διατροφής. Σε επόμενο στάδιο είναι σημαντικό να διερευνηθούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η αντικαρκινική δράση και σε άλλους τύπους καρκινικών κυττάρων.

Παράρτημα Α

Συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων στα φύλλα και ρίζες του φυτού *Eruca sativa* υπό διαφορετικές συνθήκες λίπανσης αζώτου και θείου (*Κατσαρού, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα*).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αρχές Ιατρικής Γενετικής, Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2003
- Hanahan Douglas and Weinberg Robert A. (2000) The Hallmarks of Cancer. Cell, Vol. 100, 57–70
- Το κύτταρο, Μια μοριακή προσέγγιση, Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman, Ακαδημαϊκές εκδόσεις 2011
- Sporn Michael B. and Suh Nanjoo (2000) Chemoprevention of cancer. Carcinogenesis Vol. 21, No 3 pp.525-530
- Tsao Anne S., MD; Kim Edward S., MD; Hong Waun Ki, MD (2004) Chemoprevention of cancer. CA Cancer J Clin 54:150–180
- Parsa N. (2012) Environmental Factors Inducing Human Cancers. Iranian J Publ Health Vol. 41, No.11, pp. 1-9
- Greenwald Peter, MD, DrPH, Kelloff Gary, MD, Burch-Whitman Cynthia, Kramer Barnett S., MD, MPH (1995) Chemoprevention. CA Cancer J Clin 45: 31-49
- Morse Mark A. and Stoner Gary D. (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects. Carcinogenesis Vol. 14, No 9 pp.1737-1746
- Wattenberg Lee W. (1985) Chemoprevention of cancer. Cancer Research 45, 1-8
- Hursting Stephen D., Slaga Thomas J., Fischer Susan M., DiGiovanni John, Phang James M. (1999) Mechanism-Based Cancer Prevention Approaches: Targets, Examples, and the Use of Transgenic Mice. J Natl Cancer Inst;91:215–25
- Higginson J, Muir CS (1977) Determination of the importance of environmental factors in human cancer: the role of epidemiology. Bulletin du Cancer, 64(3):365-384.
- Doll R., Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today (1981). Journal of the National Cancer Institute, 66(6):1191-1308
- Kelloff Gary J., Crowell James A., Steele Vernon E., Lubet Ronald A., Malone Winfred A., Boone Charles W., Kopelovich Levy, Hawk Ernest T., Lieberman Ronald, Lawrence Julia A., Ali Iqbal, Viner Jaye L. and Sigman Caroline C.

- (2000) Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. *J. Nutr.* 130: 467S–471S
- Wang Chong-Zhi, Calwaya Tyler and Yuan Chun-Su (2012) Herbal Medicines as Adjuvants for Cancer Therapeutics. *Am J Chin Med.*, 40(4): 657–669
 - Brenner DE and Gescher AJ (2005) Cancer chemoprevention: lessons learned and future directions. *British Journal of Cancer*, 93, 735 – 739
 - Perry LM, Metzger J (1978) Medicinal Plants of SE Asia: Attributed Properties and Uses, The MIT Press: Cambridge, London, UK; Massachusetts, USA, pp. 23–24.
 - Yaniv Z, Schafferman D, Amar Z (1998) Tradition, uses and biodiversity of rocket (*Eruca sativa*, Brassicaceae) in Israel. *Econ. Bot.*, 52: 394–400
 - Uphof JCT (1968) Dictionary of Economic Plants. Verlag Von J. Cramer Publ.: New York, NY, USA
 - Varga, J.; Apahidean, A. S.; Lujerdean, A. and Bunea, A. (2009) Study of some agrotechnological characteristics of rocket (*Eruca sativa* Mill). *Bulletin USAVM Horticulture*, 66(1): 472-474.
 - Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A (2007) Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 1724–1729
 - Martinez-Sanchez A, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F (2008) A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 2330–2340
 - Kim SJ, Jin S, Ishii G (2004) Isolation and structural elucidation of 4-(beta-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 2444–2450
 - Sarwar AM, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M (2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 45(6):910-920.
 - Alqasoumi Saleh, Al-Sohaibani Mohammed, Al-Howiriny Tawfeq, Al-Yahya Mohammed, Rafatullah Syed (2009) Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World J Gastroenterol.*, 15(16): 1958-1965

- Gulfraz Muhammad, Sadiq Alia, Tariq Hira, Imran Muhammad, Qureshi Rahmatullah and Zeenat Asyia (2011) Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1351-1359
- Khoobchandani M., Ojeswi B. K., Ganesh, N., Srivastava, M. M., Gabbanini, S., Matera R., Lori R. and Valgimigli, L. (2010) Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extract. *Food Chem.*, 120 (1): 217-224.
- Yehuda H., Khatib S., Sussan I, Musa R., Vaya J. and Tami R.S. (2009) Potential skin anti-inflammatory effects of 4methylthiobutyl isothiocyanate (MTBI) isolated from rocket (*Eruca sativa*) seeds. *Biofactors*, 35(3): 295-305.
- Alam M.S., Kaur G., Jabbar Z., Javed K. and Athar M. (2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. *Food Chem.Toxicol.*, 45: 910-920
- Michael Helana Naguib, Shafik Reham Ezzat, Rasmy George Emad (2011) Studies on the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca sativa* extract and its biological activity as anticancer agent in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(7)*, pp. 1184-1191
- Khoobchandani M., Ganesh N., Gabbanini S., Valgimigli L., Srivastava M.M. (2011) Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth. *Fitoterapia*, 82(4):647-53
- Lamy E., Schroder J., Paulus S., Brenk P., Stahl T. and MerschSundermann V. (2008) Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (Rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo (a) pyrene and their mode of action. *Food and Chern.Toxico.*, 46:2415-2421
- Melchini A. and Traka M. (2010) Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables. *Toxins*, 2: 593-612
- Mahdy S.S. (2012) The Antigenotoxicity of *Eruca sativa* Mill Extract on Bone marrow Cells of Male Albino Mice Treated With Vincristine. *Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science*, Vol.25, No 2
- Drewnowski A, Gomez-Carneros C. (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr*;72:1424–3

- Edreva A., Velikova V., Tsonev T., Dagnon S., Gürel A., Aktaş L., Gesheva E. (2008) Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiology*, special issue 34 (1-2), 67-78
- Hadacek F. (2002) Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21, 273-322
- *Plant Physiology*, Editors: Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, Fifth Edition, Sinauer Associates, Inc., 2010.
- Φυσιολογία Φυτών, Ιωάννης Β. Τσέκος, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη 2004
- Fahey J.W., Zalcman A.T., Talalay P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5–51.
- Jin J, Koroleva OA, Gibson T, Swanston J, Magan J, Zhang Y, Rowland IR, Wagstaff C (2009) Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *J. Agric. Food Chem.*, 57(12): 5227-5234.
- Wittstock U., Halkier B.A. (2002) Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant Sci.* 7, 263–270.
- Li S., Schonhof I., Krumbein A., Li, L.; Stutzel H., Schreiner M. (2007) Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa* ssp. *Rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8452–8457.
- Schonhof I., Blankenburg D., Muller S., Krumbein A. (2007) Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 65–72
- Omirou MD, Papadopoulou KK, Papastylianou I, Constantinou M, Karpouzas DG, Passam H, Ehaliotis C (2009) Impact of nitrogen and sulfur fertilization on the composition of glucosinolates in relation to sulfur assimilation in different plant organs of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:9408-9417
- Omirou M, Papastefanou C, Katsarou D, Papastylianou I, Passam HC, Ehaliotis C and Papadopoulou KK (2012) Relationships between nitrogen, dry matter accumulation and glucosinolates in *Eruca sativa* Mills. The applicability of the critical NO₃-N levels approach. *Plant and Soil*, 354:347–358

- Stavridou Eleftheria, Kristensen Hanne L., Krumbein Angelika, Schreiner Monika and Thorup-Kristensen Kristian (2012) Effect of Differential N and S Competition in Inter- and Sole Cropping of Brassica Species and Lettuce on Glucosinolate Concentration J. Agric. Food Chem. 60, 6268–6278
- Gerendas Joska, Breuning Stephanie, Stahl Thorsten, Mersch-Sundermann Volker and Mühling Karl H. (2008) Isothiocyanate Concentration in Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) Plants As Influenced by Sulfur and Nitrogen Supply. J. Agric. Food Chem.
- Textor Susanne , Bartram Stefan, Kroymann Jürgen, Falk Kimberly L., Hick Alastair, Pickett John A., Gershenzon Jonathan (2004) Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta*, Volume 218, Issue 6, pp 1026-103
- Wittstock Ute and Burow Meike (2010) Glucosinolate Breakdown in *Arabidopsis*: Mechanism, Regulation and Biological Significance. *Arabidopsis Book.*; 8: e0134.
- Grubb C. Douglas and Abel Steffen (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Plant Science* Vol.11 No.2
- Agrawal A.A. and Kurashige N.S. (2003) A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1403–1415
- Mithen R. (1992) Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Eyphytica*, 63: 71-83
- Block G., Patterson B. Subar A. (1992) Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18: 1-29
- Steinmetz K.A., Potter J.D. (1996) Vegetables, fruit and cancer prevention. A review. *J. Amer. Diet. Assoc.*, 96: 1027-1039
- Mithen R. (2001) Glucosinolates—biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul.* 34, 91–103.
- Mithen Richard F, Dekker Matthijs, Verkerk Ruud, Rabot Sylvie, Johnson Ian T. (2000) The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*

Special Issue: Nutritional Enhancement of Plant-based Food in European Trade (NEODIET) Volume 80, Issue 7, pages 967–984, 15

- Heiss E, Herhaus C, Klimo K et al (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem* 276:32008–32015
- Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM et al (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7610–7615
- Cornelis MC, El-Sohemy A, Campos H (2007) GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 86:752–758
- Valgimigli Luca and Iori Renato (2009) Antioxidant and Pro-Oxidant Capacities of ITCs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50:222–237
- Cartea ME, Velasco P. (2008) Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 7: 213–229
- Traka M, Mithen R. (2009) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* 8: 269–282.
- Verhoeven D.T.H, Goldbohm R.A., van Poppel G. Verhangen H., van den Brandt P.A. (1996) Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 5:733–748
- London SJ, Yuan JM, Chung FL et al (2000) Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356:724–729
- Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA et al (2000) Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1017–1020
- Zhao B, Seow A, Lee EJ et al (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1063–1067
- Wang LI, Giovannucci EL, Hunter D et al (2004b) Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control* 15:977–985

- Hansson LE, Nyren O, Bergstroöm R et al (1993) Diet and risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 55:181–189
- Lin HJ, Probst-Hensch NM, Louie AD et al (1998) Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:647–652
- Seow A, Yuan JM, Sun CL et al (2002) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 23:2055–2061
- Fowke JH, Chung FL, Jin F et al (2003) Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res* 63:3980–3986
- Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL et al (2004) Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr* 134:1134–1138
- Zhao H, Lin J, Grossman HB et al (2007) Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk. *Int J Cancer* 120:2208–2213
- Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL (2000) Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 92: 61–68
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y et al (2003) A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1403–1409
- Kirsh VA, Peters U, Mayne ST et al (2007) Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 99:1200–1209
- Traka Maria, Gasper Amy V., Melchini Antonietta, Bacon James R., Needs Paul W., Frost Victoria, Chantry Andrew, Jones Alexandra M. E., Ortori Catharine A., Barrett David A., Ball Richard Y., Mills Robert D., Mithen Richard F. (2008) Broccoli Consumption Interacts with GSTM1 to Perturb Oncogenic Signalling Pathways in the Prostate. *PLoS ONE* 3(7): e2568
- Musk SR, Smith TK, Johnson IT (1995) On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin. *Mutat Res* 348:19–23
- Traka M, Mithen R. 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* 8: 269–282

- Velasco Pablo, Francisco Marta, Moreno Diego A., Ferreres Federico, García-Viguerab Cristina and Cartea María Elena (2011) Phytochemical Fingerprinting of Vegetable Brassica oleracea and Brassica napus by Simultaneous Identification of Glucosinolates and Phenolics. *Phytochem. Anal.*, 22, 144–152
- Sugie S, Okamoto K, Okumura A et al (1994) Inhibitory effects of benzyl thiocyanate and benzyl isothiocyanate on methylazoxymethanol acetate-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 15:1555–1560
- Zhang Y, Kensler TW, Cho CG et al (1994) Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3147–3150
- Gerhauser C, You M, Liu J et al (1997) Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 57:272–278
- Chung FL, Conaway CC, Rao CV et al (2000) Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 21:2287–2291
- Conaway CC, Wang CX, Pittman B et al (2005) Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice. *Cancer Res* 65:8548–8557
- Barcelo S, Gardiner JM, Gescher A et al (1996) CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis* 17:277–282
- Maheo K, Morel F, Langouet S et al (1997) Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res* 57:3649–3652
- Juge N, Mithen RF, Traka M (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* 64:1105–1127
- Mithen R, Faulkner K, Magrath R et al (2003) Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theor Appl Genet* 106:727–734

- Bogaards JJ, Verhagen H, Willems MI et al (1994) Consumption of Brussels sprouts results in elevated alpha class glutathione S-transferase levels in human blood plasma. *Carcinogenesis* 15:1073–1075
- Razis Ahmad F. Abdull, Bagatta Manuela, De Nicola Gina R., Iori Renato, Ioannides Costas (2010) Intact glucosinolates modulate hepatic cytochrome P450 and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity of cruciferous vegetables. *Toxicology* 277, 74–85
- Hanlon Paul R., Webber David M. and Barnes David M. (2007) Aqueous Extract from Spanish Black Radish (*Raphanus sativus* L. Var. *niger*) Induces Detoxification Enzymes in the HepG2 Human Hepatoma Cell Line. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6439-6446
- Ye L, Zhang Y (2001) Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 22:1987–1992
- Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* 269: 291–304.
- Lixin Mi, Nanqin Gan and Fung-Lung Chung (2010) Isothiocyanates inhibit proteasome activity and proliferation of multiple myeloma cells.
- Hwang Jae-Woong, Park Goon-Suk, Jo Eun-Hye, Kim Sun-Jung, Yoon Byoung-Su, Kim Sung-Hoon, Lee Yong-Soon and Kang Kyung-Sun (2005) Chinese Cabbage Extracts and Sulforaphane Can Protect H₂O₂-Induced Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication through the Inactivation of ERK1/2 and p38 MAP Kinases. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8205-8210-
- Barillari J, Gueyrard D, Rollin P, Iori R (2001) *Barbarea verna* as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate, *Fitoterapia*, Volume 72, Issue 7, 760-764
- Scudiero Dominic A., Shoemaker Robert H., Paull Kenneth D., Monks Anne, Tierney Siobhan, Nofziger Thomas H., Currens Michael J., Seniff Donna and Boyd Michael R. (1988) *Cancer Research* 48. 4827-4833.
- Paull K. D., Shoemaker R. H. , Boyd M. R., Parsons J. L., Risbood P. A., Barbera W. A. , Sharma M. N., Baker D. C., Hand E., Scudiero D. A., Monks A., Alley M. C., and Grote M. (1988) The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J. Heterocycl. Chem.* 25:911

- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45:106–114
- Srinibas Das, Amrish Kumar Tyagi and Harjit Kaur (2000). "Cancer modulation by glucosinolates: A review". *Current Science* 79 (12): 1665.