



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

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“ Βιοτεχνολογία – Ποιότητα διατροφής και περιβάλλον ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών
εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα των
σταδίων παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού
ροδιά (*Punica Granatum*), στην κυτταρική αύξηση
και την απόπτωση καρκινικών κυττάρων του μαστού
MCF-7.**



Μοσχοβίδη Γεωργία

ΛΑΡΙΣΑ 2013



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

Study of the effect of polyphenolic extracts of products and by-products of the process of producing pomegranate juice from *Punica Granatum* in cell growth and apoptosis in breast cancer cells MCF-7.

Μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από προϊόντα και παραπροϊόντα των σταδίων παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού ροδιά (*Punica Granatum*), στην κυτταρική αύξηση και την απόπτωση καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7.

Μοσχοβίδη Γεωργία

Τριμελής επιτροπή

- **Στάγκος Δημήτριος (επιβλέπων):** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Κουρέτας Δημήτριος:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Αμούτζιας Γρηγόριος:** Λέκτορας Βιοπληροφορικής στη Γενομική, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Ευχαριστίες

Για την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής διατριβής θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Στάγκο Δημήτριο για τη βοήθειά του και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της. Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο που μου έδωσε τη δυνατότητα πραγματοποίησης αυτής της εργασίας στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών το οποίο και διευθύνει, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της διατριβής μου. Τέλος, ευχαριστώ το μεταπτυχιακό φοιτητή Ματάκο Αντώνη και την υπ.Διδάκτορα Κερασιώτη Θάλεια για την όλη βοήθεια και στήριξή τους.

Περίληψη

Μία από τις σημαντικότερες ασθένειες του σύγχρονου κόσμου είναι ο καρκίνος. Μια πληθώρα μελετών έχει πραγματοποιηθεί για να βρεθούν τρόποι αντιμετώπισης αλλά και προφύλαξής του. Τα τελευταία χρόνια δίνεται όλο ένα και μεγαλύτερη σημασία στη χημειοπροφύλαξη η οποία βασίζεται στα φυσικά βιοδραστικά μόρια των φυτικών τροφών και των ιδιοτήτων τους. Ιδιαίτερη σημασία στις έρευνες έχει δοθεί στις φυτικές πολυφαινόλες.

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά (*Punica granatum*). Από τα εκχυλίσματα αυτά μελετήθηκε η ανασταλτική τους δράση σε διάφορες συγκεντρώσεις σε καρκινικά κύτταρα της σειράς MCF-7 με τη μέθοδο του 'ΧΤΤ'. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μέσω της τιμής του IC₅₀ του κάθε εκχυλίσματος βρέθηκε ότι όχι μόνο το τελικό προϊόν, ο χυμός του ροδιού, έχει αντικαρκινική ιδιότητα αλλά και τα ενδιάμεσα προϊόντα και απορρίμματα, γεγονός το οποίο βασίζεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών σε φυτικές πολυφαινόλες. Στη συνέχεια της ερευνητικής εργασίας επιλέχθηκε ένα από τα πιο ισχυρά για την αντικαρκινική του ιδιότητα εκχύλισμα και μελετήθηκε η δυνατότητα πρόκλησης απόπτωσης στα ίδια κύτταρα (MCF-7) σε συγκέντρωση κοντά στο IC₅₀ του, έπειτα από τη δράση του επί 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, και 16 ώρες. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά και η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν η κυτταρομετρία ροής. Με την ίδια μέθοδο επίσης, στην ίδια συγκέντρωση και στα ίδια κύτταρα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) και της γλουταθειόνης (GSH) έπειτα από τη δράση του ίδιου εκχυλίσματος επί 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Τα μεν πρώτα παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα χωρίς καμία αξιόλογη μεταβολή και τα μεν δεύτερα παρουσίασαν μία αυξανόμενη τάση.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας προτείνεται η περεταίρω επεξεργασία και αξιοποίηση των απορριμμάτων μίας βιομηχανίας παραγωγής χυμού ροδιού με σκοπό τη δημιουργία νέων προϊόντων ή εμπλουτισμό των ήδη υπαρχόντων προς όφελος της υγείας του ανθρώπου.

Abstract

One of the most important diseases in modern world nowadays is cancer. There has been accomplished a big amount of researches about its treatment and precaution. In recent years it is given a greater importance in chemoprevention that is based on natural bioactive molecules of plant foods and their properties. Particular attention has been given in research on plant polyphenols.

To this specific research has been studied polyphenolic extracts from products and by-products of the process of producing pomegranate juice from the plant *Punica granatum*. From this extracts has been studied its inhibitory activity in different concentrations in breast cancer cells MCF-7 with the 'XTT' method. Comparing the results of their IC_{50} price, it has been shown that not only the final product, the pomegranate juice, has anticancer property but also the intermediate products and the wastes. This is actually based on the fact that these products have great concentration of plant polyphenols compared with the final product, the pomegranate juice. Then, in this research work has been choosed one of the most powerful anticancer extract and has been studied its potential of triggering apoptosis to the same cells (MCF-7) in concentration near to its IC_{50} , after the effect of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 16 hours. Our results were positive and we have used the flow cytometry method for these. With the same method, same concentration and the same cells we have determined the levels of free radicals (ROS) and glutathione (GSH) after the effect of the same extract of 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 16 hours. The first, it is found that were in high levels but without any remarkable change and the second showed an increasing trend.

So, according to the results of this study it is proposed the further processing and exploitation of wastes of pomegranate juice industry with the view of the creation of new products or enrichment of the already existing for the benefit of human health.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	7
Κατάλογος γραφημάτων	11
Κατάλογος πινάκων	12
Κατάλογος εικόνων	12
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή</u>	15
1.1. Η ροδιά	16
1.1.1 Το ρόδι στην Ινδική Αγιουρβέδα.....	16
1.1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	17
1.1.3 Ποικιλίες	19
1.1.4 Βιομηχανική επεξεργασία για παραγωγή χυμού.....	25
1.1.5 Χημική σύσταση του χυμού του ροδιού.....	26
1.1.6 Διαιτητική αξία του ροδιού	29
1.1.7 Ρόδι – ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο.....	33
1.2 Καρκίνος	37
1.2.1 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης	41
1.2.2 Καρκίνος του μαστού	42
1.2.2.1 Ανατομία του στήθους	43
1.2.2.2 Στατιστικά στοιχεία	44
1.2.2.3 Αίτια	45
1.2.2.4 Συμπτώματα	46
1.2.2.5 Μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού.....	46
1.2.2.6 Διάγνωση	47
1.2.2.7 Μετάσταση	48
1.2.2.8 Θεραπεία	48
1.2.2.9 Καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού	48
1.2.3 Χημειοπροφύλαξη.....	50
1.2.3.1 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.....	50

1.2.4 Καρκινική σειρά MCF-7	55
1.2.5 Φυτοχημικά συστατικά	56
1.3 Ελεύθερες ρίζες και καρκινογένεση	60
1.4 Γλουταθειόνη	61
1.5 Απόπτωση	62
1.5.1 Στόχευση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων- Μιτοχονδριακή ρύθμιση	64
1.5.2 Άμεση σηματοδοτική οδός	65
1.5.3 Εκτέλεση	66
1.5.4 Απομάκρυνση νεκρών κυττάρων	66
1.6 Σκοπός	69
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι</u>	70
2.1 Υλικά	71
2.2 Εκχυλίσματα	72
2.3 Μέθοδοι	79
2.3.1 Καλλιέργεια της καρκινικής σειράς MCF-7	79
2.3.2 Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT	79
2.3.2.1 Αρχή της μεθόδου	79
2.3.2.2 Πειραματική διαδικασία	80
2.3.3 Κυτταρομετρία Ροής	81
2.3.3.1 Συσκευές κυτταρομετρίας ροής	84
2.3.4 Απόπτωση	86
2.3.5 Προσδιορισμός Ελευθέρων ριζών (ROS) και Γλουταθειόνης (GSH)	87
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα</u>	88
3.1 Προσδιορισμός αντικαρκινικής ικανότητας εκχυλισμάτων χυμού ροδιού με τη μέθοδο του XTT	89
3.2 Κυτταρομετρία Ροής	94
3.2.1 Πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 σε συνάρτηση με το χρόνο	94
3.2.2 Προσδιορισμός των επιπέδων των ελεύθερων ριζών (ROS) στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα σε συνάρτηση με το χρόνο	97

3.2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα σε συνάρτηση με το χρόνο.....	100
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:</u>	103
Συζήτηση – Συμπεράσματα	104
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Βιβλιογραφία</u>	108
5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία	109
5.2 Ξένη Βιβλιογραφία	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Γραφική απεικόνιση ολικών φαινολικών των δειγμάτων.....	76
Γράφημα 2. Γραφική απεικόνιση ολικών φλαβονοειδών των δειγμάτων.....	77
Γράφημα 3. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 2 (ενδιάμεσο προϊόν - επισπέρματα με λίγες φλούδες).....	90
Γράφημα 4. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός).....	90
Γράφημα 5. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 6 (ενδιάμεσο προϊόν - πούλπα με λιγότερα στερεά).....	91
Γράφημα 6. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 7 (απόρριμμα - μορφή πούλπας).....	91
Γράφημα 7. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 7 (απόρριμμα - μορφή πούλπας).....	92
Γράφημα 8. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το εκχύλισμα 9 (τελικό προϊόν - χυμός ροδιού).....	92
Γράφημα 9. Γραφική απεικόνιση των τιμών του IC ₅₀ των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν σε µg/ml.....	93
Γράφημα 10. Επίδραση του Εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50µg/ml στην πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 σε συνάρτηση με το χρόνο (0 ώρες = Control).	95
Γράφημα 11. Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50µg/ml και σε συνάρτηση με το χρόνο (0 ώρες = Control).....	97
Γράφημα 12. Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) σε όλες τις χρονικές στιγμές, από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.	98
Γράφημα 13. Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50µg/ml και σε συνάρτηση με το χρόνο (0 ώρες = Control). (*) στατιστικά σημαντικές τιμές σε σχέση με την τιμή του 0 = Control (P<0,05).....	100

Γράφημα 14. Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) σε όλες τις χρονικές στιγμές, από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.....	101
---	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Θρεπτική αξία χυμού ανά 100gr βρώσιμου φρούτου ποικιλίας Wonderful (USDA).....	27
Πίνακας 2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες και ο αντίστοιχος μηχανισμός δράσης τους για την πρόκληση απόπτωσης.....	68
Πίνακας 3. Λίστα δειγμάτων.....	74
Πίνακας 4. Απόδοση εκχύλισης.....	75
Πίνακας 5. Ολικά φαινολικά των δειγμάτων.....	76
Πίνακας 6. Ολικά φλαβονοειδή των δειγμάτων.....	77
Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις μονομερών πολυφαινολών των εκχυλισμάτων	78

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μέρη του φυτού <i>Punica granatum</i> (ροδιά).....	17
Εικόνα 2. Άνθος ροδιάς.....	17
Εικόνα 3. Καρπός ροδιάς.....	18
Εικόνα 4. Αρίλια ροδιού.....	18
Εικόνα 5. Ρόδια ποικιλίας 'Wonderful'.....	20
Εικόνα 6. Ρόδια της ποικιλίας 'Granada'.....	20
Εικόνα 7. Ρόδια της ποικιλίας 'Sweet'.....	21
Εικόνα 8. Ρόδια της ποικιλίας 'Angel Red'.....	21
Εικόνα 9. Χυμός ροδιού.....	26
Εικόνα 10. Α) Ανθοκυάνες, Β) Κατεχίνες, C) Πουνικαγαλινό, D) Ελαγικό οξύ, Ε) συνικαλαγικό.....	28
Εικόνα 11. Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων.....	41

Εικόνα 12. Εικόνα μαστογραφίας: αριστερά φυσιολογικός μαστός και δεξιά μαστός με καρκίνο.....	42
Εικόνα 13. Ανατομία στήθους.....	44
Εικόνα 14. Κύρια συμπτώματα του καρκίνου του μαστού.....	46
Εικόνα 15. Εικόνα μαστογραφίας.....	47
Εικόνα 16. Καρκινικά κύτταρα MCF-7.....	55
Εικόνα 17. Βασικός ανθρακικός σκελετός της χημικής δομής των φλαβονοειδών	57
Εικόνα 18. Τα φλαβονοειδή αντιδρούν με ένα μεγάλο εύρος μορίων που συμπεριλαμβάνονται στην απόπτωση και στα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιδρώντας στην έκφρασή του ή στην ενεργοποίησή τους. Στο διάγραμμα συνοψίζονται όλα στα στοιχεία που των δύο αυτών μονοπατιών τα οποία έχει αναφερθεί ότι επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή αλλά αυτό δε σημαίνει ότι αυτά είναι άμεσοι στόχοι αυτών των διαιτητικών στοιχείων. Με μαύρα γράμματα είναι αυτά τα στοιχεία που προκαλούν αλλαγές κοινές σε όλα τα επιλεγμένα φλαβονοειδή, με μαύρα γράμματα σε γκρι πλαίσιο είναι τα στοιχεία με τα οποία παρατηρήθηκαν αλλαγές σε δύο φλαβονοειδή και με γκρι γράμματα είναι οι στόχοι που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος αλλά δεν αναφέρεται ότι ρυθμίζουν οποιοδήποτε φλαβονοειδές (Ramos, 2007)	58
Εικόνα 19. Χημική δομή της σεκοϊσολαρισιρεσινόλης και της ματαιρεσινόλης και των αντίστοιχων λιγνάνων των θηλαστικών	59
Εικόνα 20. Χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης.....	60
Εικόνα 21. Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH).....	62
Εικόνα 22. Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, GSSH.....	62
Εικόνα 23. Σημεία δειγματοληψίας στη βιομηχανική γραμμή παραγωγής χυμού ροδιού της εταιρίας Vitom.....	73
Εικόνα 24. Elisa plate με κύτταρα και εκχύλισμα.....	80
Εικόνα 25. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της κυτταρομετρίας.....	82
Εικόνα 26. Υδροδυναμική στίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.....	82
Εικόνα 27. Κυτταρόμετρο στο οποίο μετρήθηκαν τα δείγματα.....	84
Εικόνα 28. Tube μέσα στο οποίο αναλύονταν το δείγμα μας.....	85
Εικόνα 29. Χρωστικές απόπτωσης: Annexin V, 7-AAD και Binding Buffer.....	86
Εικόνα 30. Χρωστικές DCF και Mercury Orange.....	87

- Εικόνα 31.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες96
- Εικόνα 32.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μελέτης της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με Annexin V και 7-AAD των MCF-7 κυττάρων που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Κάθε τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει διαφορετική κατάσταση των κυττάρων. Το κάτω αριστερά τετράγωνο δείχνει τα ζωντανά κύτταρα του πληθυσμού, το κάτω δεξιά δείχνει τα προ-αποπτωτικά κύτταρα του πληθυσμού, το πάνω δεξιά τετράγωνο δείχνει τα αποπτωτικά κύτταρα και τέλος το πάνω αριστερά δείχνει τα νεκρωτικά κύτταρα.96
- Εικόνα 33.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν στην πάνω σειρά την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και στην κάτω σειρά την αντίστοιχη γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) στα ίδια κύτταρα έπειτα από την ίδια μεταχείριση.99
- Εικόνα 34.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν στην πάνω σειρά την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και στην κάτω σειρά την αντίστοιχη γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στα ίδια κύτταρα έπειτα από την ίδια μεταχείριση.102

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

‘Εισαγωγή’

1.1. Η ροδιά

Παραδοσιακά, το ρόδι αποτελεί σύμβολο ευτυχίας και καλοτυχίας. Ο μύθος λέει: "Ρόδι... ο καρπός τον Ολύμπιων θεών". Το ρόδι σύμβολο της ζωής, της γονιμότητας και της ευημερίας, είναι ο καρπός που από τα αρχαία χρόνια, θεοί και άνθρωποι λάτρευαν. Εννοιολογικώς το ρόδι ή η ροδιά είναι άμεσα συνδεδεμένα με την λέξη Ρόδος και ασφαλώς σημαίνει την ΡΟΗ και την ΔΥΝΑΜΗ. Ο καρπός περικλείει εσωτερικά πολλούς κόκκους (αρίλια) τα οποία με την σειρά τους περικλείονται μέσα σε κίτρινες μεμβράνες, ενώ εξωτερικά στο κάτω μέρος του υπάρχει η προεξοχή που είναι ότι έχει απομείνει από το προγενέστερο άνθος.



Η ροδιά λέγεται ότι εμφανίστηκε στην περιοχή ανάμεσα στο Ιράν και τη Βόρεια Ινδία, για να καλλιεργηθεί αργότερα συστηματικά και στη Μεσόγειο, όπου μεταφέρθηκε από τους Φοίνικες και τους άραβες εμπόρους. Από την εποχή της αρχαιότητας, ο χυμός των σπόρων υποβαλλόταν σε επεξεργασία για τη δημιουργία ανθεκτικών βαφών και μελάνης, ενώ σήμερα ο χυμός χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική και στην ποτοποιία.

1.1.1 Το ρόδι στην Ινδική Αγιουρβέδα:

Στο αρχαίο Ινδικό ιατρικό σύστημα Αγιουρβέδα (Ayurveda), το ρόδι χρησιμοποιείται εκτενώς ως πηγή παραδοσιακών θεραπειών για πολλές ασθένειες. Ο φλοιός του ροδιού και ο φλοιός του δέντρου της ροδιάς, χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία ενάντια στη διάρροια, τη δυσεντερία και τα παράσιτα του πεπτικού συστήματος. Οι σπόροι και ο χυμός του ροδιού θεωρούνται ευεργετικά για την καρδιά και το λαιμό.

1.1.2 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η ροδιά (*Punica granatum* L.) ανήκει στην οικογένεια Punicaceae, στο γένος *Punica*. Το όνομά της προέρχεται από Λατινικές λέξεις, *romum* που σημαίνει μήλο και *granatus* που σημαίνει με σπόρια.

Το φυτό είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος αλλά με κατάλληλο κλάδευμα μπορεί να διαμορφωθεί και σε μικρό δένδρο. Η ροδιά έχει μεγάλη διάρκεια ζωής που μπορεί να φτάσει τα 50 ή και 70 χρόνια. Τα φύλλα είναι λογχοειδή, μικρά με αντίθετη διάταξη. Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους και φέρονται πάντοτε πλάγια στο βλαστό ανά δύο σε κάθε κόμβο. Οι ξυλοφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται κατά την άνοιξη (μέσα Μαρτίου– μέσα Απριλίου) δίνοντας κανονική ή λογχοειδή βλάστηση η οποία φέρει ξυλοφόρους και μικτούς καρποφόρους οφθαλμούς. Οι μικτοί καρποφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται κατά το



Εικόνα 1. Μέρη του φυτού *Punica granatum* (ροδιά)

Μάιο δίνοντας βραχεία βλάστηση συνήθως άφυλλη με άνθη στην άκρη. Τα άνθη της είναι μεγάλα, κόκκινου ή λευκού χρώματος πιο σπάνια. Φέρονται σε ομάδες των 2-7, στην άκρη της τρέχουσας βλάστησης η οποία εκπτύσσεται από πλάγιους, μικτούς οφθαλμούς βλαστών παρελθόντος έτους. Διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους: τα άγονα και τα καρποφόρα. Τα καρποφόρα άνθη συνήθως εμφανίζονται σε παλιό ξύλο



Εικόνα 2. Άνθος ροδιάς

ενώ τα άγονα στη νέα βλάστηση. Κάθε άνθος αποτελείται από 5 ή περισσότερα σέπαλα και ισάριθμα πέταλα ζωηρού κόκκινου ή λευκοκίτρινου χρώματος που φυτρώνουν γύρω από τους στήμονες και τον ύπερο. Η ροδιά ανθοφορεί για πρώτη φορά μετά το 4^ο με 5^ο έτος της ζωής της αλλά διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα ξεκινώντας από τα τέλη Μαΐου.

Οι καλύτεροι καρποί παράγονται από τα πρώιμα άνθη, πιθανόν γιατί ευνοούνται από τις καιρικές συνθήκες. Η ροδιά είναι αυτογόνιμη, δηλαδή η επικονίαση γίνεται είτε από το ίδιο το φυτό είτε από τα έντομα και γι' αυτό δεν υπάρχει πρόβλημα επικονίασης. Η μέλισσα δεν είναι απαραίτητη για να αυξηθεί η παραγωγή επειδή τα άνθη δεν έχουν νέκταρ. Ο καρπός της είναι ραγοειδής (σίδιο). Εξωτερικά φέρει ένα σχετικά κόκκινο, παχύ, δερματώδη ιστό (τροποποιημένη

ανθοδόχη) αλλά λείπει το σαρκώδες μεσοκάρπιο. Εσωτερικά αποτελείται από ένα λευκού χρώματος ιστό (πλακούντα) που προέρχεται από τα τοιχώματα της ωοθήκης. Στον πλακούντα προσφύονται τα καρπίδια (ερυθρού χρώματος) τα οποία αποτελούνται από τα σπέρματα και ένα σαρκώδη και χυμώδη ιστό (αρίλιο) που τα περιβάλλει, χρώματος από άσπρο μέχρι σκούρο κόκκινο έως μωβ. Τα σπέρματα περιβάλλονται κατά ομάδες από λεπτούς μεμβρανώδεις ιστούς που αποτελούν τα τοιχώματα της ωοθήκης. Ο αριθμός των σπερμάτων μπορεί να φτάσει κατά μέσο όρο τα 650-670/καρπό. Οι καρποί της συγκομίζονται το φθινόπωρο και χρησιμοποιούνται είτε ως νωποί είτε ως επεξεργασμένοι για χυμοποίηση και όχι μόνο. Γενικά ο καρπός του ροδιού αποτελείται από 24% φλοιό, 14% σπόρια και 62% χυμό.



Εικόνα 3. Καρπός ροδιάς



Εικόνα 4. Αρίλια ροδιού

1.1.3 Ποικιλίες

Σε αντίθεση με άλλα φυτά, η ροδιά κατατάσσεται σε μια δικιά της οικογένεια φυτών, αυτή των Punicaceae που έχει μόνο ένα γένος, το Punica και ένα κυρίαρχο είδος το Punica granatum. Υπάρχει και ένα δεύτερο είδος το P. protopunica το οποίο είναι ροδιά μικρότερου μεγέθους που ευδοκίμει σε ορισμένα απομονωμένα νησιά όπως τα Γκαλαμπάγκος.

Υπάρχουν όμως πάρα πολλές ποικιλίες ροδιάς (αναφέρονται πάνω από 400 παγκοσμίως) που διαφέρουν στο χρώμα και σχήμα του καρπού, στη σκληρότητα και το χρώμα των αριλίων και στην περιεκτικότητά τους σε χυμό. Ο όρος ποικιλία (κλώνος) αναφέρεται σε μία ομάδα φυτών τα οποία έχουν την ίδια γενετική σύσταση και τα οποία προέκυψαν από ένα αρχικό μητρικό δέντρο με αγνή πολλαπλασιασμό. Με τις κατάλληλες διασταυρώσεις μπορούμε πλέον να πετύχουμε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για την κατάλληλη χρήση. Ανάλογα με την ποικιλία ο χυμός μπορεί να διαφέρει ως προς τη γλυκύτητα, οξύτητα ή να είναι περισσότερο ή λιγότερο στυφός. Η Ινδία είναι μια χώρα με παράδοση στην καλλιέργεια ροδιάς και εκεί έχουν ονομαστεί πολλές από τις ποικιλίες της.

Στο Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων του ΕΘΙΑΓΕ στη Νάουσα αξιολογήθηκαν τα αγρονομικά αλλά και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ροδιών από 20 γενοτύπους ροδιάς που προήλθαν κυρίως από τη Βόρεια Ελλάδα. Αποτελέσματα της μελέτης που έγινε έδειξαν πως αν και τα μεγάλου μεγέθους ρόδια είναι πιο αρεστά στον καταναλωτή, αυτά συνήθως είναι πιο ξινά όπως υποδηλώνεται από σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ βάρους καρπού και οξύτητας. Οι ροδιές γενικά διακρίνονται σε ξινές ποικιλίες (>1,8 % οξέα), μέσης οξύτητας (0,9-1,8 % οξέα) και γλυκές ποικιλίες (<0,9 % οξέα). Επίσης τα κόκκινου χρώματος ρόδια ήταν και περισσότερο χονδρόφλουδα ή και μικρού μεγέθους. Επίσης, βρέθηκε πως υπάρχει παραλλακτικότητα στη διατροφική ωφελιμότητά τους αφού η αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού διέφερε μέχρι και δύο φορές μεταξύ των 20 γενοτύπων ροδιάς. Βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των ροδιών από τις οποίες συμπεραίνεται πως οι καταναλωτές που ενδιαφέρονται για τα διαιτολογικά καλύτερα ρόδια πρέπει να διαλέγουν ποικιλίες που παράγουν μικρού μεγέθους ή και κόκκινου χρώματος καρπούς γιατί αυτοί μπορεί να έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, μεγαλύτερη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος και ανθοκυανών στο χυμό τους.

Παρακάτω είναι μερικές από τις ποικιλίες ροδιάς και τα χαρακτηριστικά τους:

‘Akko’ (πρώιμη)

Κλώνος που κατάγεται από το Ισραήλ. Οι καρποί της ωριμάζουν νωρίς και συγκομίζονται περί τα τέλη Σεπτεμβρη. Είναι μεσαίου μεγέθους (300-400γρ) και έχουν πολύ γλυκιά γεύση. Το χρώμα του φλοιού είναι κόκκινο.

‘Wonderful’ (όψιμη)

Είναι η πιο εμπορική ποικιλία και αυτή που προωθείται περισσότερο στην Ελλάδα. Η ποικιλία αυτή προήλθε από μόσχευμα από τη Φλόριντα των Η.Π.Α. αλλά στη συνέχεια ο πολλαπλασιασμός της έγινε στην Καλιφόρνια το 1896. Οι καρποί είναι μεγάλου μεγέθους, με σχήμα ελλειψοειδές, βάρους >400γρ, έχουν γλυκόξινη γεύση και



Εικόνα 5. Ρόδια ποικιλίας 'Wonderful'

αποκτούν καλύτερη ποιότητα σε ζεστά κλίματα. Οι σπόροι δεν είναι σκληροί, με αποτέλεσμα οι καρποί να προσφέρονται περισσότερο για παρασκευή χυμών παρά για νωπή κατανάλωση. Ο φλοιός είναι μετρίου πάχους με βαθύ κόκκινο χρώμα. Συγκομίζονται στα τέλη Σεπτεμβρίου με μέσα Οκτωβρίου. Τα δέντρα είναι παραγωγικά και ζωνηρά. Έχει καλή παραγωγή σε αλκαλικά εδάφη.

‘Granada’

Παράγει ρόδια που είναι πιο μικρά από αυτά της Wonderful αλλά είναι πολύ πιο κόκκινα. Τα ρόδια της ποικιλίας Granada ωριμάζουν περίπου ένα μήνα νωρίτερα από αυτά της ποικιλίας Wonderful.



Εικόνα 6. Ρόδια της ποικιλίας 'Granada'

‘Sweet’

Παράγει τα πιο γλυκά και ζουμερά ρόδια από όλες τις ποικιλίες. Η σάρκα τους έχει ροζ χρώμα. Το ύψος του δέντρου φτάνει τα 4 μέτρα.



Εικόνα 7. Ρόδια της ποικιλίας 'Sweet'

‘Angel Red’

Είναι μία πρόσφατη ποικιλία ροδιάς. Έχει αρχίσει να γίνεται δημοφιλής τα τελευταία χρόνια. Τα ρόδια που παράγει ωριμάζουν τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρίου, νωρίτερα δηλαδή από τις υπόλοιπες ποικιλίες. Η ποικιλία Angel Red παράγει τα περισσότερα ρόδια από τις άλλες ποικιλίες. Ο καρπός έχει ένα φωτεινό κόκκινο χρώμα και είναι πολύ ζουμερός. Μάλιστα τα ρόδια αυτής της ποικιλίας προτιμούνται για την παραγωγή χυμού ροδιού. Ένα ακόμη πλεονέκτημα που έχει είναι ότι



Εικόνα 8. Ρόδια της ποικιλίας 'Angel Red'

τα σπόρια είναι συνήθως μαλακά, έχουν γλυκιά γεύση και μπορούν να καταναλωθούν.

‘Ganesh’

Οι καρποί αυτής της ποικιλίας έχουν μαλακά σπόρια, ροζ σάρκα και έχουν πλούσιο, εύγευστο χυμό.

‘Dholka’

Έχει μεγάλους σε μέγεθος καρπούς με κιτρινοπράσινο φλοιό, ροζ-άσπρα σαρκώδη αρίλια, μαλακά σπόρια και όξινο χυμό.

‘Jodhpur Local’

Οι καρποί είναι μεσαίου μεγέθους με σκληρό φλοιό, σαρκώδη ανοιχτά ροζ αρίλια, γλυκό χυμό και μέτριας σκληρότητας σπόρια.

‘Bedana’

Καρπός μετρίου προς μεγάλου μεγέθους, φλοιός πρασινοκαφέ, σαρκώδη ανοιχτά ροζ ή άσπρα αρίλια με πολύ γλυκό χυμό και μαλακά σπόρια.

‘Kandhari’

Οι καρποί αυτής της ποικιλίας είναι μεγάλοι, σκούρο κόκκινοι, με σκούρο ροζ ή βαθυκόκκινο υπόξινο χυμό και σκληρά σπόρια.

‘Kabul’

Μεγάλοι καρποί με σκούρο κόκκινο και κίτρινο φλοιό και σαρκώδη βαθυκόκκινα αρίλια που δίνουν έναν γλυκό και ελαφρώς πικρό χυμό.

‘Muscat Red’

Μικροί με μεσαίου μεγέθους καρποί με λεπτό φλοιό και μέτριο έως γλυκό χυμό.

‘Paper Shell’

Στρογγυλός μεσαίου προς μεγάλου μεγέθους καρπός, με ανοιχτό κίτρινο και ελαφρώς ροζ λεπτό φλοιό, σαρκώδη κοκκινωρόζ γλυκά αρίλια και μαλακά σπόρια.

‘Poona’

Σκουροκόκκινοι ή γκριζοπράσινοι καρποί καμιά φορά με στίγματα και πορτοκαλοκόκκινο ή ροδοκόκκινο χυμό.

‘Spanish Ruby’

Στρογγυλοί καρποί μεσαίου μεγέθους με φωτεινό κόκκινο λεπτό φλοιό και γλυκό, αρωματικό χυμό και σχετικά μαλακά σπόρια.

‘Vellodu’

Μεσαίου με μεγάλου μεγέθους καρπός, μετρίου πάχους φλοιός, σαρκώδη και χυμώδη αρίλια και σχετικά σκληρά σπόρια.

‘Muskat White’

Μεγάλοι, λευκοί με ροζ χρώμα καρπών με λεπτό φλοιό και σαρκώδη ανοιχτόχρωμα αρίλια με γλυκό χυμό.

Άλλες ξένες ποικιλίες είναι επίσης οι:

Belegal	Francis
Cloud	Green globe
Crab	King
Fleshman	Phoenicia

Οι ποικιλίες ροδιάς ανάλογα με το ποσοστό σακχάρων που περιέχουν οι καρποί τους κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Σε αυτές που οι καρποί τους περιέχουν γλυκούς σπόρους και οι οποίοι καταναλώνονται σαν επιτραπέζιοι καρποί.
- Και σε αυτές που οι καρποί τους περιέχουν γλυκόξινους σπόρους. Τα ρόδια αυτά χρησιμοποιούνται στη μεταποίηση με σκοπό την παραγωγή χυμών ή γρεναδίνης ή αλκοολούχων ποτών.

Το ίδιο ισχύει και με τις Ελληνικές ποικιλίες ροδιάς, οι οποίες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις **Γλυκιές** ροδιές και τις **Ξινές** ροδιές (ξινοροδιές).

Γλυκιές ροδιές

- Πολίτικη
- Καράβελος

Ξινές Ροδιές

- Λειφάνια
- Τσιποροδιά
- Χοντροροδιά (Καμπάτικα)
- Κρασοροδιά
- Γούνες
- Ξινοροδιά (Αγριοκαμπάτικα)

Η ροδιά επίσης ορισμένων γενοτύπων χρησιμοποιείται και σαν καλλωπιστικό φυτό. Οι βασικές ποικιλίες που καλλιεργούνται σήμερα στην Ελλάδα είναι στις νότιες περιοχές η **‘Ερμιόνη’** και στη Βόρεια Ελλάδα η τοπική ποικιλία με το όνομα **«Αλμπάνικα»**. Στον κόσμο, από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι η «Wonderful». Σήμερα στην Καλιφόρνια η ποικιλία «Granada» αρχίζει να αντικαθιστά την «Wonderful» λόγω καλύτερου χρωματισμού. Σε μικρότερη έκταση καλλιεργείται και η παλαιότερη σε σύγκριση με τη «Wonderful» ποικιλία η «Spanish Ruby».

Στην Ελλάδα, η ροδιά είναι ένα φυτό που φύτεται από την αρχαιότητα, αλλά τα τελευταία χρόνια άρχισε να καλλιεργείται συστηματικά. Ένας λόγος παραπάνω είναι ότι η αξία της στο ‘χρηματιστήριο’ των οικονομικών αποδόσεων δεν είναι καθόλου ευκαταφρόνητη!

Τα τελευταία χρόνια, άρχισε να αναπτύσσεται η καλλιέργεια της ροδιάς στην Ελλάδα με γρήγορους ρυθμούς κυρίως στο πλαίσιο της συμβολαιακής γεωργίας από εταιρείες που παράγουν χυμούς ροδιού.

Οι αποδόσεις ανά δένδρο κυμαίνονται μεταξύ 40 – 50κιλών και ανά στρέμμα 2.500 – 3.000κιλών. Το κόστος εγκατάστασης ενός στρέμματος καλλιέργειας ροδιάς ανέρχεται σε 540 ευρώ, ενώ το καθαρό εισόδημα είναι 1.000-1.200 ευρώ ανά στρέμμα.

Η ροδιά μπορεί να μπει σε καρποφορία από το 3ο ή το 4ο έτος μετά την εγκατάστασή της, ενώ σε πλήρη παραγωγή φθάνει μετά το 7ο-8ο έτος. Κατά την πλήρη παραγωγή της αποδίδει 2,5-3,0 τόνους/στρέμμα εμπορεύσιμο ρόδι και σε μερικές περιπτώσεις μεγαλύτερη. Ένα φυτό σε ώριμη ηλικία παράγει περίπου 100

εμπορεύσιμους καρπούς. Η ωρίμανση των καρπών της ροδιάς κλιμακώνεται σε μία διάρκεια δύο μηνών.

Στον Νομό Αργολίδας μόνο, και συγκεκριμένα στην περιοχή της Ερμιόνης παράγονται 300-400 τόνοι ροδιών για επιτραπέζια χρήση. Τα τελευταία χρόνια σε πολλούς νομούς της Ελλάδας (Αργολίδας, Ηλείας, Λακωνίας, Μεσσηνίας, Πέλλας, Ξάνθης, Λάρισας, Σερρών) έγιναν αρκετές φυτεύσεις νέων φυτειών ροδιάς, κυρίως της ποικιλίας Wonderful, που είναι κατάλληλη για παραγωγή χυμών. Τον ίδιο προσανατολισμό έχουν και 60 αγρότες του νομού Αιτωλοακαρνανίας, πρώην καπνοπαραγωγοί, που συνέστησαν πρόσφατα έναν συνεταιρισμό για την παραγωγή και εκμετάλλευση των ροδιών.

Η ελληνική αγορά είναι ελλειμματική όσον αφορά τα ρόδια και για τον λόγο αυτό κάθε χρόνο γίνονται εισαγωγές που φθάνουν τους 800 τόνους, ενώ η συνολική κατανάλωση ροδιών φθάνει τους 1.000-1.200 τόνους. Οι κυριότερες χώρες από τις οποίες γίνονται οι εισαγωγές είναι η Τουρκία, το Ιράν, η Ινδία, η Αίγυπτος, το Ισραήλ. Οι εισαγόμενες ποσότητες ροδιών αφορούν κυρίως ρόδια ξινών και γλυκόξινων ποικιλιών και οι οποίες κυρίως χρησιμοποιούνται στην παραγωγή χυμών. Πέραν όμως των ροδιών, στη χώρα μας εισάγονται και πολλά άλλα προϊόντα διατροφής, όπως είναι χυμοί, ποτά, αναψυκτικά, γιαούρτια, παγωτά, μαρμελάδες κλπ. αλλά και καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν συστατικά των ροδιών.

Μέχρι προ λίγων ετών, η ροδιά βρισκόταν στο περιθώριο του ενδιαφέροντος των καταναλωτών αλλά και των παραγωγών στις διάφορες χώρες του κόσμου. Το 2004 όμως στις ΗΠΑ, έγινε η μεγάλη στροφή στην προτίμηση του καταναλωτικού κοινού. Η αλλαγή αυτή ξεκίνησε με μία μεγάλη ενημερωτική καμπάνια, που είχε σαν στόχο την ενημέρωση του καταναλωτικού κοινού για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του χυμού της ροδιάς. Το έτος αυτό ονομάστηκε «έτος του χυμού της ροδιάς». Η μεγάλη αυτή δημοσιότητα έστρεψε το κοινό προς την κατεύθυνση της κατανάλωσης προϊόντων της ροδιάς, με αποτέλεσμα να γίνεται λόγος σήμερα στις ΗΠΑ για αδυναμία κάλυψης της ζήτησης.

1.1.4 Βιομηχανική επεξεργασία για παραγωγή χυμού

Ο βασικότερος τρόπος μεταποίησης του ροδιού είναι η παραγωγή φρέσκου συσκευασμένου χυμού. Για να έχει ο χυμός τα καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά θα πρέπει ο καρπός να συγκομιστεί στο κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης. Όλα τα φρούτα πετυχαίνουν το βέλτιστο της ωρίμανσής τους όταν ωριμάσουν στο δέντρο. Παρόλα αυτά όμως ορισμένα φρούτα συλλέγονται σε στάδιο που έχουν μεν σχηματιστεί αλλά δεν έχουν ακόμη ωριμάσει ώστε να αντέξουν την μετέπειτα επεξεργασία και τη μεταφορά προς τις αγορές. Τα ρόδια είναι φρούτα τα οποία σταματούν να ωριμάζουν μετά τη συγκομιδή γι' αυτό πρέπει να κόβονται στο βέλτιστο της ωρίμανσής τους. Η απόδοση του καρπού σε χυμό κυμαίνεται από 24-39% του βάρους του φρούτου. Εξαρτάται από τα επιθυμητά επίπεδα της συγκέντρωσης σε αντιοξειδωτικά τα οποία μπορεί να είναι υψηλά ή χαμηλά.

Μετά τη συγκομιδή οι καρποί ελέγχονται, διαλέγονται, πλένονται εξωτερικά με νερό ή άλλα απολυμαντικά μέσα και στη συνέχεια οδηγούνται προς εκχύμωση. Η συνήθης διαδικασία είναι η απομόνωση των αριλίων από το φλοιό και η συμπίεση ή φυγοκέντρισή τους για την παραλαβή του χυμού. Η συμπίεση θα πρέπει να γίνεται με προσοχή για να μην περάσουν στο χυμό ανεπιθύμητες ουσίες από τα σπόρια.

Καθώς η ζήτηση του χυμού από ρόδι έχει αυξηθεί τελευταία, πολλές εταιρίες έχουν κατασκευάσει αυτοματοποιημένες μηχανές παραγωγής χυμού από ρόδι όπως η Mazda Specialty Machine Systems της Ινδίας και η Zhecheng Jingxin Superhard Abrasive Material & Products Co της Κίνας.

Εκτός από το χυμό, μία βιομηχανία μπορεί να αξιοποιήσει και τα ξηρά σπόρια προς παραγωγή ελαίων και σκόνης αλλά και τους φλοιούς αποξηραμένους προς παραγωγή σκόνης ή τανινών. Το επόμενο στάδιο είναι η διαύγαση του χυμού από διάφορα σωματίδια όπως ίνες, άμυλο ή πολυφαινόλες που τον καθιστούν θολό. Η διαύγαση γίνεται με πηκτινολυτικά ένζυμα, με κολλοειδή διαλύματα, με ορυκτά υλικά ή με ζελατίνη ή ακόμα και με φυγοκέντρωση. Μπορεί επίσης ο χυμός να περάσει μέσα από διάφορα φίλτρα για καλύτερα αποτελέσματα. Έπειτα ακολουθεί η απαέρωση του χυμού, η παστερίωση και τέλος η ασηπτική συσκευασία. Η διαδικασία της παστερίωσης είναι η πιο κρίσιμη καθώς είναι το στάδιο στο οποίο καθορίζεται η διατηρησιμότητα του προϊόντος αλλά και η ποιοτική υποβάθμιση των οργανοληπτικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών του.

1.1.5 Χημική σύσταση του χυμού του ροδιού

Για να μελετήσουμε καλύτερα τις ευεργετικές ιδιότητες του χυμού του ροδιού πρέπει να ξέρουμε και τη χημική του σύσταση. Η περιεκτικότητα του χυμού στα διάφορα συστατικά του παρουσιάζει αρκετές διαφορές ανάλογα όχι μόνο με την ποικιλία αλλά και με την περιοχή καλλιέργειας, το κλίμα της περιοχής και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού.

Από έρευνες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι ο χυμός από ένα ώριμο ρόδι αποτελεί περίπου το 32,8% του συνολικού βάρους του φρούτου. Η περιεκτικότητά του σε υγρασία είναι 83,6% και τα ολικά στερεά μετρημένα σε βαθμού Brix κυμαίνονται από 14-16%.

Τα σάκχαρα και η οξύτητα καθορίζουν κυρίως την ποιότητα του χυμού και τη γεύση του και γι' αυτό είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την αναλογία τους κατά την ωρίμανση του φρούτου έτσι ώστε να κοπεί στην κατάλληλη εποχή. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη αυξάνονται κατά την ωρίμανση δίνοντας στο χυμό μεγαλύτερη γλυκύτητα ενώ η οξύτητα παρουσιάζει μείωση στις περισσότερες ποικιλίες. Τα οργανικά οξέα που εντοπίζονται στο χυμό του ροδιού είναι κυρίως το κιτρικό, το μαλικό, το ταρταρικό, το οξαλικό και το κινικό με κυρίαρχα τα πρώτα δύο. Ο χυμός επίσης περιέχει πρωτεΐνες, ένζυμα λιπίδια που βρίσκονται στα σπόρια, βιταμίνες και μέταλλα. Στο έλαιο τέλος, των κουκουτσιών βρίσκεται το πουνικό οξύ σε αναλογία 65% το οποίο είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα ρόδια (Sturgeon and Ronnenberg, 2010).



Εικόνα 9. Χυμός ροδιού

Θρεπτικά Συστατικά	Αξία / 100gr
Νερό	77,93 gr
Ενέργεια	83Kcal/ 346kJ
Πρωτεΐνες	1,67gr
Ολικά λιπαρά	1,17gr
Τέφρα	0,53gr
Υδατάνθρακες	18,7gr
Φυτικές ίνες	4gr
Ολικά σάκχαρα	13,67gr
Ασβέστιο, Ca	10mg

Σίδηρος, Fe	0,3mg
Μαγνήσιο, Mg	12mg
Φώσφορος, P	36mg
Κάλιο, K	236mg
Νάτριο, Na	3mg
Ψευδάργυρος, Zn	0,35mg
Χαλκός, Cu	0,158mg
Μαγνήσιο, Mn	0,119mg
Σελήνιο, Se	0,5mg
Ολικό ασκορβικό οξύ (Βιταμίνες C)	10,2mg
Θειαμίνη	0,067mg
Ριβοφλαβίνη	0,053mg
Νιασίνη	0,293mg
Βιταμίνη B-6	0,075mg
Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)	0,6mg
Βιταμίνη K (φυλοκινόνη)	16,4mg
Λιπαρά οξέα, ολικά κορεσμένα	0,12gr
Λιπαρά οξέα, ολικά μονοκορεσμένα	0,093gr
Λιπαρά οξέα, ολικά πολυκορεσμένα	0,079gr
Λιπαρά οξέα, τρανς λιπαρά	0,009gr
Καμπεστερόλη	1mg
Βήτα- σιτοστερόλη	4mg

Πίνακας 2. Θρεπτική αξία χυμού ανά 100gr βρώσιμου φρούτου ποικιλίας Wonderful (USDA)

Τα ένζυμα που βρίσκονται στο χυμό έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς συντελούν σε μεγάλο αριθμό λειτουργιών. Κατά την ωρίμανση του φρούτου για παράδειγμα συμβάλλουν ώστε να γίνει πιο μαλακό, συμμετέχουν στη ανάπτυξη της γεύσης και στην παραγωγή του αιθυλενίου (λειτουργεί σαν ορμόνη διεγείροντας την

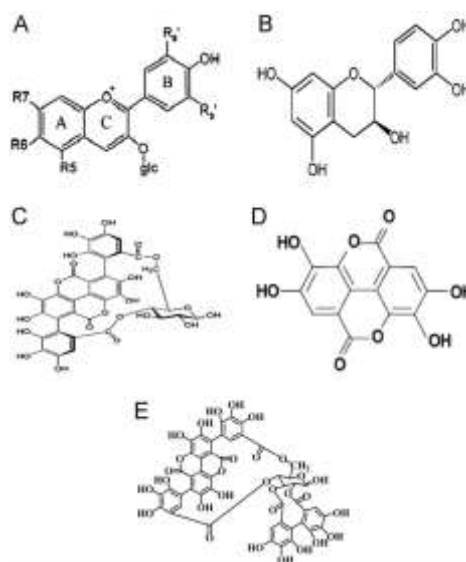
έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων) (Kesaria et al, 2007). Μια άλλη σημαντική κατηγορία ενζύμων είναι οι οξειδάσες όπως η πολυφαινολική οξειδάση (PPO) και η περοξειδάση που ευθύνονται για το ενζυμικό μαύρισμα και την αλλοίωση της γεύσης γι' αυτό και αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την ποιότητα του χυμού. (Hui et al, 2006)

Η σύσταση όμως του χυμού του ροδιού διαφέρει σημαντικά από ποικιλία σε ποικιλία και αυτό έχει ερευνηθεί σε πληθώρα ερευνητικών εργασιών. Σε οχτώ ποικιλίες από το Ιράν παράδειγμα έχει βρεθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ταννινών το έχει η ποικιλία Sweet Alak (3 mg/l), το περισσότερο ελαγικό οξύ η Saveh Black Leather (160 mg/l) ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα ποικίλει και σχετίζονται με τα συνολικά φαινολικά οξέα που έχει κάθε ποικιλία. Οι υψηλότερες τιμές που βρέθηκαν σε ολικά φαινολικά είναι στις ποικιλίες Ostokhani Tabas (9304 mg/l), Malase Ashkezar (8129 mg/l), Malase Ardestan (7923 mg/l) και Sooleghan (7438 mg/l), (Gelareh et al, 2009).

Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των καρπών οι Kulkarni και Aradhya (2005) βρήκαν ότι αλλάζει η χημική σύσταση του χυμού τους. Δηλαδή με την αύξηση του ποσοστού των ανθοκυανών παρατηρήθηκε μία μείωση του ποσοστού των φαινολικών οξέων.

Στην Κορέα το ρόδι χρησιμοποιείται συχνά στην παραδοσιακή ιατρική κατά των παθογόνων βακτηρίων και συγκεκριμένα σε έρευνα με ποντίκια τα οποία είχαν μολυνθεί με *Salmonella typhimurium* και δεν τους χορηγήθηκε χυμός ροδιού, παρατηρήθηκε ότι ήταν σε λήθαργο, εμφανίζοντας σημάδια ιστολογικής καταστροφής στο συκώτι και στη σπλήνα σε αντίθεση με αυτά που τους είχε χορηγηθεί χυμός ροδιού (Jang-Gi Choi et al, 2009).

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ινδία σε έξι ποικιλίες ροδιάς, βρέθηκε ότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων στις Μεσογειακές ποικιλίες διαφέρει από αυτή των ανατολικών ποικιλιών. Συγκεκριμένα, οι ξινές ποικιλίες είχαν υψηλότερο ποσοστό ελαίου από τις γλυκόξινες ποικιλίες. Συνολικά έντεκα λιπαρά οξέα αναγνωρίστηκαν



Εικόνα 10. Α) Ανθοκυάνες, Β) Κατεχίνες, Γ) Πουνικαγαλινό, Δ) Ελαγικό οξύ, Ε) Πουνικαλαγικό

αλλά από τα πιο σημαντικά ήταν το λινολεϊκό (25.2–38.6%), το ολεϊκό(24.8–35.5%), το παλμιτικό (18.2–22.6%), το στεαρικό (6.9–10.4%) και το λινολενικό οξύ(0.6–9.9%). Σε λιγότερα ποσοστά βρέθηκαν τα αραχιδικό (1.1–3.4% και παλμιτελαϊκό οξύ(0.2–2.7%) (Parashar, 2010).

Παρά το γεγονός ότι ο χυμός της ποικιλίας ‘Wonderful’ είναι πλούσιος σε βιοενεργά συστατικά, μερικές προσθήκες χυμών από άλλες ποικιλίες προσδίδουν μεγάλη οξύτητα. Ωστόσο, άλλες προσθήκες προσδίδουν αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς υψηλή οξύτητα. Σε αντίθεση με αυτούς τους χυμούς, αυτός της ποικιλίας ‘Valenciana’ χαρακτηρίζεται από καλές χρωματικές παραμέτρους και της ‘Mollar de Elche’ από καλές οργανοληπτικές ιδιότητες ανώτερης ποιότητας από τους άλλους άλλων ποικιλιών που μελετήθηκαν. Ο συνδυασμός αυτών των χυμών μπορεί να αυξήσει την κατανάλωση του χυμού ροδιού. Επιπλέον, όλοι οι χυμοί είχαν υψηλό ποσοστό σε πολυφαινόλες και διάφορες ανθοκυανίνες (Mena et all, 2010).

Η αντιοξειδωτική ιδιότητα του ροδιού οφείλεται κατά 92% στις ελλαγιτανίνες οι οποίες περιέχονται στις φλούδες, στις μεμβράνες ή στο χυμό του. Οι πιο σημαντικές ελλαγιτανίνες που βρίσκονται στο ρόδι είναι οι πουνικαλαγίνες οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν σε ελλαγικό οξύ άλλες μικρότερες πολυφαινόλες (Seeram et all, 2004; Sturgeon and Ronnenberg, 2010).

Ανάμεσα στα πιο κοινά φρούτα που καταναλώνει ο άνθρωπος, το ρόδι είναι αυτό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πουνικαγαλικού οξέος. Έρευνες έχουν δείξει ότι το πουνικαγαλικό οξύ έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αντιμυκητιακές και αντιβακτηριδιακές. Παρακάτω είναι η δομή μερικές από τις πιο σημαντικές φαινόλες που υπάρχουν στις φλούδες του ροδιού (Ismail et all, 2012).

Σε μια Ισπανική έρευνα από διάφορες ποικιλίες ροδιού συμπεριλαμβανομένου της Wonderful και της Mollar de Elche, βρέθηκε ότι ο χυμός περιέχει γλυκόζη και φρουκτόζη σαν βασικά σάκχαρα, με τη φρουκτόζη να βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τη γλυκόζη (Mena et all, 2012).

1.1.6 Διαιτητική αξία του ροδιού

Ο καρπός της ροδιάς εκτιμάται ιδιαίτερα από καταναλωτές που γνωρίζουν και εκτιμούν τη διαιτητική του αξία και την υπέροχη γεύση του. Με βάση την παραγωγή της ροδιάς σήμερα παράγονται 475 διαφορετικά προϊόντα (τρόφιμα, ποτά, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά κλπ). Επίσης βρίσκονται στο εμπόριο

αποξηραμένοι σπόροι ροδιού (ολόκληροι ή σε σκόνη) οι οποίοι χρησιμοποιούνται πολύ στην κουζίνα των Ινδιών. Υπάρχουν ακόμη και διάφορα άλλα προϊόντα, όπως ξίδι από ρόδι, σάλτσες ροδιού κλπ.

Είναι γενικά γνωστό από την παράδοση πως το ηδύποτο που παρασκευάζεται από ρόδι (γρεναδίνη) είναι πολύ ευεργετικό σε πυρετικές καταστάσεις. Πυκνό αφέψημα του φλοιού ροδιών και της ρίζας χρησιμοποιείτο ως ανθελμινθικό και ιδίως κατά της ταινίας, της δυσεντερίας και της διάρροιας. Επίσης, αφέψημα των ανθέων ροδιάς έχει καλή επίδραση κατά της παθητικής αιμορραγίας και ενδείκνυται για γαργάρες και πλύσεις του στόματος σε περίπτωση αμυγδαλίτιδας και ουλίτιδας και κατά του δηλητηρίου του σκορπιού. Επίσης μερικά μέρη του φυτού της ροδιάς χρησιμοποιούνται στη βυρσοδεψία για την επεξεργασία των δερμάτων λόγω της αυξημένης περιεκτικότητάς τους σε τανίνη. Ο φλοιός του καρπού είναι και φαρμακευτικός και βαφικός για τη βαφή μάλλινων και μεταξωτών νημάτων. Η πούλπα των καρπών της ροδιάς χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική πολλών λαών της Μεσογείου. Ο χυμός του ροδιού είναι μία μεγάλη πηγή χαλκού για τον οργανισμό του ανθρώπου. Τα άνθη της είναι φαρμακευτικά και ο φλοιός της ρίζας χρησιμοποιείται από την παραδοσιακή ιατρική, εναντίον της ταινίας. Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των καρπών της ροδιάς τους καθιστούν βασικούς παράγοντες της βιομηχανίας φαρμάκων και της βιομηχανίας παραγωγής καλλυντικών κυρίως για την παραγωγή προϊόντων που αφορούν τη φροντίδα του δέρματος των ανθρώπων, αλλά και προϊόντων προστασίας του δέρματος από τον καρκίνο.

Υπάρχει όμως και μία πληθώρα ερευνητικών εργασιών που αποδεικνύουν τις ευεργετικές ιδιότητες των ροδιών. Αύξηση της κατανάλωσης ροδιών βρέθηκε πως μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, την ανάπτυξη του ιού HIV-1, την οξείδωση της HDL και την αρτηριοσκλήρωση και να μειώσει τα συμπτώματα κατάθλιψης και απώλειας οστικής μάζας κατά την εμμηνόπαυση. Επιδρώντας στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και ιδιαίτερα της LDL-χοληστερόλης, οι αντιοξειδωτικές ουσίες από το ρόδι, μειώνουν τον κίνδυνο αθηρωμάτωσης των αγγείων. Μειώνοντας τον κίνδυνο αυτό, μειώνεται ο κίνδυνος απόφραξης των αγγείων, εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικών επεισοδίων. Οι Ισραηλινοί επιστήμονες εισηγούνται την κατανάλωση ενός ποτηριού χυμού ροδιού την ημέρα για την πρόληψη και μείωση των θανάτων λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το ίδιο ισχυρίζονται και άλλοι επιστήμονες καθώς έπειτα από κλινικές δοκιμές ο χυμός του ροδιού έδειξε μια μείωση στη συστολική πίεση όπως επίσης και μια σειρά από άλλες

καρδιαγγειακές ωφέλειες, συμπεριλαμβανομένου και μια μείωση της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης (Bell Stowe, 2011). Τους ίδιους ισχυρισμούς έχουν και οι Anvram και Dornfield (2001) οι οποίοι πιστεύουν επίσης και σε μια μείωση της χοληστερίνης από το χυμό του ροδιού. Αυτή η έρευνα έδειξε ότι ο χυμός ροδιού έχει αξιοσημείωτες αντι-αρτηριοσκληρωτικές, αντι-υπερτασικές, αντιοξειδωτικές και αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων και σε μοντέλα ποντικών. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης του χυμού του ροδιού μπορεί να περιλαμβάνει μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης προκαλώντας έτσι μία συνολική θετική επίδραση στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και της επακόλουθης δυνητικής ανάπτυξης της στεφανιαίας νόσου (Bell Stowe, 2011). Πολλές έρευνες επίσης κατέδειξαν τις αντικαρκινικές ιδιότητες του ροδιού σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων και γι' αυτό το ρόδι έχει χαρακτηριστεί ως το σούπερ φρούτο της φύσης (Longtin, 2003). Συγκεκριμένα σε δύο σειρές καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7 και MB-MDA-231) έχει βρεθεί η ανασταλτική δράση του φυσικού χυμού ροδιού λόγω των πολυφαινολών του (Adhami and Mukhta, 2006).

Επίσης, αφέψημα από το φλοιό ροδιού έχει βρεθεί πως έχει αντιϊκή και μυκητοκτόνο δράση καθώς και πολλές άλλες θετικές για την υγεία του ανθρώπου ιδιότητες. Οι δράσεις του ροδιού πιθανόν οφείλονται στην υψηλή αντιοξειδωτική του ικανότητα λόγω της παρουσίας φαινολικών ουσιών όπως η πουνικαλαγίνη (η λέξη προέρχεται από το λατινικό όνομα της ροδιάς) και η ελαγιτανίνη που βρίσκονται σε όλα τα μέρη του ροδιού. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον σχετικά με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των κόκκινων φρούτων, επειδή είναι πλούσιες πηγές σε αντιοξειδωτικές φαινόλες και ανθοκυανίνες, γεγονός που τους προσδίδει μεγάλη διατηρητική αξία. Το σύνολο των αντιοξειδωτικών που περιέχει κάθε τρόφιμο μετράται με βάση τον δείκτη ORAC. Σύμφωνα με τους ειδικούς συνιστάται οι ημερήσιες τροφές που καταναλώνει ένα ενήλικο άτομο, να περιέχουν τουλάχιστον 3.000 μονάδες ORAC. Τα 100g καρπών ροδιού περιέχουν 3.200 μονάδες ORAC.

Είναι γνωστό ότι ο χυμός του ροδιού είναι από τις πιο σημαντικές πηγές ανθοκυανινών (κυανιδίνη, δελφινιδίνη και πελαργονιδίνη) καθώς και φαινολών και ταννινών (πουνικαλίνη, πουνικαλαγίνη, κατεχίνη, κερκετίνη και τα οξέα γαλλικό, κουμαρικό και ελλαγικό οξύ). Είναι επίσης γνωστό πως η αντιοξειδωτική ικανότητα του χυμού ροδιάς είναι τρεις φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή του κόκκινου κρασιού και του πράσινου τσαγιού.

Στο Ινστιτούτο Φυλλοβόλων Δένδρων του ΕΘΙΑΓΕ της Νάουσας, όπου αξιολογήθηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά 20 ποικιλιών ροδιάς από τη Βόρεια Ελλάδα, βρέθηκε ότι ποικιλίες που παράγουν μικρού μεγέθους ή και κόκκινου χρώματος καρπούς έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και μεγαλύτερη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος και ανθοκυανών στο χυμό τους. Επίσης, βρέθηκε πως αν και τα μεγάλου μεγέθους ρόδια είναι πιο αρεστά στον καταναλωτή αυτά συνήθως είναι και πιο ξινά. Αυτό υποδηλώνεται από θετική συσχέτιση μεταξύ βάρους καρπού και οξύτητας ενώ η οπτική αξιολόγηση των ποικιλιών ροδιάς έδειξε πως τα πιο αρεστά ρόδια ήταν οι μεγάλοι καρποί. Επίσης τα κόκκινου χρώματος ρόδια ήταν και περισσότερο χονδρόφλουδα ή μικρού μεγέθους. Είναι επίσης γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η μέθοδος έκθλιψης και παραγωγής χυμού ροδιού μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητά του. Ο χυμός ροδιού που παρήχθηκε σε ειδικό μηχάνημα έκθλιψης είχε διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με αυτό που παρήχθηκε με το χέρι, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης πουνικαλαγίνης, ουσίας που βρίσκεται κυρίως στο φλοιό και τις μεμβράνες του καρπού και πιθανόν πέρασε στον εμπορικό χυμό κατά τη διαδικασία παραγωγής του.

Επίσης από άλλες έρευνες έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση πολυφαινόλων στις λευκές μεμβράνες του φρούτου είναι συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη από αυτή στο χυμό των αριλίων και των σπερμάτων. Επίσης οι ολικές πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν ήταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το χυμό άλλων φρούτων που θεωρούνται πλούσια σε αντιοξειδωτικά όπως το σταφύλι το ακτινίδιο και το κόκκινο δαμάσκηνο. Επίσης τα αντιοξειδωτικά που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή των πολυφαινόλων στο χυμό του ροδιού, συνεισφέρουν στη μείωση του οξειδωτικού στρες και στην αθηρογένεση με ανασταλτικές και προ-αποπτωτικές δράσεις σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα (Syed et al, 2007). Τέλος, τα αντιοξειδωτικά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι οι ανθοκυανίνες και οι ταννίνες που βρίσκονται στη μεμβράνη του καρπού ενώ ο χυμός είναι πλούσιος σε ολικές πολυφαινόλες (Noda et al, 2002).

Ο χυμός επίσης περιέχει ασκορβικό οξύ το οποίο δρα ως αντιοξειδωτικό, δίνοντας ηλεκτρόνια στις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Έχει βρεθεί ένας μέσος όρος ασκορβικού οξέος που περιέχεται σε χυμό αριλίων (0,032gr/100ml χυμού) (Ozgen et al, 2008). Και πάλι η περιεκτικότητα εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία. Επίσης από την ποικιλία εξαρτώνται και τα ολικά διαλυτά στερεά του

χυμού. Η ποικιλία ‘Wonderful’ στο Ισραήλ βρέθηκε ότι έχει 17,5° Brix στο χυμό από αρίλια έπειτα από μέτρηση με διαθλασίμετρο (Shwartz et al, 2009). Οι τιμές ολικών στερεών σε χυμό αριλίων από γηγενείς ισπανικές ποικιλίες κυμαίνονται από 12,3 έως 16,3 Brix (Martinez et al, 2006) ενώ σε ποικιλίες του Ομάν από 13,6 έως 15,1 Brix (Al-Said et al, 2009). Μεγάλη διακύμανση τέλος παρουσιάζουν οι τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας στις διάφορες ποικιλίες ροδιάς ανά τον κόσμο, η οποία εκφράζεται σε gr κιτρικού οξέος/100ml χυμού. Για παράδειγμα οι τούρκικες ποικιλίες βρέθηκε ότι έχουν από 0,5 έως 3,8 gr κιτρικού οξέος / 100ml χυμού έπειτα από τιτλοδότηση με 0,1M NaOH (Ozgen et al, 2008). Στις ελληνικές ποικιλίες βρέθηκε από 0,2 έως 2,4 gr κιτρικού οξέος / 100 ml χυμού (Drogoudi et al, 2005). Σε ποικιλίες ροδιάς του Ομάν οι τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας κυμαίνονται από 0,058 έως 0,48 gr κιτρικού οξέος/ 100ml χυμού (Al-Said et al, 2009). Τέλος, σε ισπανικές ποικιλίες οι τιμές κυμαίνονται από 0,26 έως 1,01 gr κιτρικού οξέος/100ml χυμού (Martinez et al, 2006).

1.1.7 Ρόδι – ένα νέο λειτουργικό τρόφιμο

Η ροδιά καλλιεργείται ήδη από την αρχαιότητα και αποτελούσε σύμβολο ζωής και γονιμότητας όπως είπαμε για πολλούς πολιτισμούς καθώς είχε παρατηρηθεί από πολύ νωρίς πως ο χυμός της και το έλαιο των σπόρων της είχαν αντιμικροβιακές ιδιότητες και βοηθούσαν στη θεραπεία των φλεγμονών. Οι ισχυρισμοί αυτοί τώρα επιβεβαιώνονται και επιστημονικά. Σήμερα είναι γνωστό πως οι ταννίνες, τα αλκαλοειδή και η πουνικαλαγίνη του ροδιού δρουν καταστροφικά σε πολλά βακτήρια, ιούς και μύκητες. Αντιμικροβιακές ιδιότητες του χυμού του ροδιού έχει βρεθεί πως έχουν αντικαρκινική δράση και δρουν ευεργετικά στην καρδιαγγειακή λειτουργία. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, η συνολική παγκόσμια παραγωγή ροδιού ανέρχεται στα 2.250.000 τόνους με βασικές χώρες παραγωγής την Ινδία και το Ιράν. Αν και δεν έχει προσδιοριστεί, η παγκόσμια παραγωγή έχει αυξητικές τάσεις καθώς οι καταναλωτές έχουν ενημερωθεί για τις ευεργετικές αυτές ιδιότητες του ροδιού. Το ίδιο ισχύει και για τη χώρα μας καθώς όλο και περισσότεροι οπωρώνες ροδιάς εγκαθίστανται. Από τα μέχρι τώρα στοιχεία, παρατηρείται μια συνεχώς ανάπτυξη της καλλιέργειας ροδιάς. Συγκεκριμένα, είναι ένα ελλειμματικό προϊόν, με αποτέλεσμα να βρίσκεται στο επίκεντρο τόσο της ελληνικής όσο και της διεθνής αγοράς.

Μάλιστα, πολλές εταιρίες, που παράγουν προϊόντα με βάση τα ρόδια δείχνουν πρόθυμες να συνεργαστούν με Έλληνες παραγωγούς. Από την άλλη, οι Έλληνες καταναλωτές προτιμούν τα ντόπια προϊόντα από τα εισαγόμενα και τείνουν να αγοράζουν προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας όπως αυτά που προέρχονται από ροδιές. Πρόκειται λοιπόν, για μια καινοτόμα και ριζοσπαστική καλλιέργεια, που σίγουρα έχει να «δώσει» πολλά στην ελληνική γεωργία.

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον επικεντρώνεται στη παραγωγή ροδιού όχι τόσο για τη νωπή του κατανάλωση αλλά για τη μεταποίησή του και τις χρήσεις του προς όφελος της υγείας όπως σε κρέμες προσώπου ή συμπληρώματα διατροφής. Για όλες αυτές τις ευεργετικές του ιδιότητες το ρόδι πλέον κατατάσσεται στα λειτουργικά τρόφιμα. Ένα τρόφιμο θεωρείται λειτουργικό όταν εκτός από τη βασική διατροφική του αξία παρουσιάζει ευεργετικές επιδράσεις σε μία ή πολλές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού προάγοντας την υγεία ή μειώνοντας τον κίνδυνο κάποιων ασθενειών. Η βιομηχανία τροφίμων είναι πλέον σε θέση να παράγει λειτουργικά τρόφιμα είτε αφαιρώντας κάποια επιβαρυντικά για την υγεία συστατικά του αρχικού τροφίμου (π.χ. κορεσμένα λιπαρά) είτε προσθέτοντας πολύτιμα συστατικά (π.χ. φυτικές ίνες, ω-3 λιπαρά οξέα ή φυτοστερόλες). Η βιομηχανία των λειτουργικών τροφίμων βρίσκεται σε μεγάλη άνθηση αυτή την περίοδο καθώς η ζήτηση για αυτά τα προϊόντα όλο και αυξάνεται. Σ' αυτό έχει συμβάλει η εξάπλωση του δυτικού τρόπου ζωής που βασίζεται στην υπερκατανάλωση κορεσμένων λιπαρών και trans-λιπαρών οξέων που οδήγησε στην αύξηση των ασθενειών όπως ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, η παχυσαρκία και ο καρκίνος. Οι βιομηχανίες τροφίμων προωθούν την έρευνα σε αυτόν τον τομέα και επενδύουν στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών προϊόντων. Σύμφωνα με τις αναφορές των βιομηχανιών, 190 καινούργια προϊόντα που περιέχουν στοιχεία ροδιού δημιουργήθηκαν στις ΗΠΑ τους πρώτους 10 μήνες του 2005 σε σχέση με τα 33 προϊόντα που υπήρχαν το 2003 (Sturgeon and Ronnenberg, 2010).

Το 2010 κατοχυρώθηκαν 23 κλινικές δοκιμές με το National Institutes of Health (<http://www.nih.gov/>) για να εξεταστούν οι επιδράσεις εκχυλισμάτων από ρόδι ή από την απλή κατανάλωση χυμού από ρόδι, για τις παρακάτω ασθένειες:

- Καρκίνος του προστάτη
- Υπερπλασία του προστάτη

- Διαβήτης
- Λέμφωμα
- Λοίμωξη Ρινοϊκού
- Κοινό κρυολόγημα
- Οξειδωτική τάση στη διαβητική αιμοδιαπίδυση
- Αθηροσκλήρωση
- Στεφανιαία νόσο
- Βρεφική εγκεφαλική βλάβη
- Αιμοδιαπίδυση για νεφρική ανεπάρκεια

Συνοπτικά δηλαδή οι θεραπευτικές δράσεις του ροδιού είναι:

1. Αποτροπή ανάπτυξης καρκινικών όγκων, HIV-1, οξείδωσης της LDL και αρτηριοσκλήρωσης.
2. Προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος.
3. Αντιδιαβητική δράση .
4. Μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και απώλειας οστικής μάζας κατά την εμμηνόπαυση.
5. Αντιϊκή και αντιμυκοτοκτόνο δράση.

Σε προκαταρκτικές κλινικές έρευνες σε ανθρώπους, βρέθηκε ότι ο χυμός του ροδιού είναι αποτελεσματικός στη μείωση του κινδύνου από παθήσεις της καρδιάς, αρτηριοσκλήρωση και καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σε μία περιορισμένη έρευνα σε υπερτασικούς ασθενείς, βρέθηκε ότι η κατανάλωση χυμού από ρόδι για δύο εβδομάδες, οδήγησε σε μείωση της συστολικής πίεσης. Η κατανάλωση χυμού από ρόδι αναχαιτίζει τις ιογενείς λοιμώξεις, ενώ εκχυλίσματα από ρόδι έχουν αντιβακτηριδιακή δράση έναντι της οδοντικής πλάκας.

Στα προστατικά καρκινικά κύτταρα που καθοδηγούνται από τα ανδρογόνα και εκφράζουν το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), η θεραπεία με εκχύλισμα ροδιού μείωσε του υποδοχείς ανδρογόνων και την έκφραση του PSA.

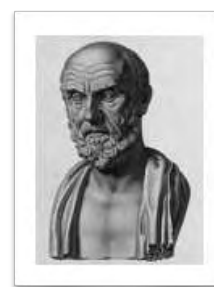
Όταν ανθρώπινα προστατικά καρκινικά κύτταρα ενέθηκαν σε ποντίκια, η σίτιση των πειραματόζωων με εκχύλισμα ροδιού καθυστέρησε την εκδήλωση των όγκων. Η ανάπτυξη των όγκων ανεστάλη σημαντικά και η επιβίωση παρατάθηκε.



1.2 Καρκίνος

«Η τροφή μπορεί να είναι φάρμακο για τον άνθρωπο και το φάρμακο μπορεί να αναζητηθεί στην τροφή»

Ιπποκράτης, 460-377 π.χ.



Προέλευση της λέξης Καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως «πατέρας της ιατρικής». Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε τους όρους «καρκίνος» και «καρκίνωμα» για να περιγράψει διάφορους όγκους που εμφάνιζαν εσωτερικά ή εξωτερικά έλκη και διογκώσεις. Στην Ελληνική γλώσσα οι λέξεις αυτές αναφέρονται στα καβούρια, τα οποία θυμίζουν τον καρκίνο, αφού οι ακτινωτές μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων, φέρνουν στο μυαλό τη μορφή που έχουν τα πόδια και οι δαγκάνες του καβουριού.

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Το έτος 2000 διαγνώστηκαν δέκα εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου, ενώ έξι εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως είχαν ως αιτία τον καρκίνο. Στις Η.Π.Α. κάθε χρόνο ενάμιση εκατομμύρια άτομα πληροφορούνται πως πάσχουν από κάποια μορφή καρκίνου (Robbins & Cotran, 2003). Υπάρχει μια μεγάλη συσσώρευση γνώσης γύρω από τον καρκίνο αλλά παρ' όλα αυτά το πρόβλημα δεν έχει λυθεί γιατί δεν έχουν εξηγηθεί όλα τα μονοπάτια εξέλιξής του.

Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται μία ομάδα νοσημάτων, που η αιτία τους βρίσκεται σε κυτταρικό επίπεδο. Συγκεκριμένα αναφέρεται στην υπερβολική, χωρίς προγραμματισμό, ανάπτυξη κυττάρων του οργανισμού, που ήταν φυσιολογικά, μέχρι τη στιγμή της έναρξης της διαδικασίας καρκινογένεσης. Οργανικά, ο καρκίνος είναι μία ασθένεια των κυττάρων. Συνεπώς, η κατανόηση του καρκίνου προϋποθέτει μία μικρή αναφορά σχετικά με το τι συμβαίνει όταν φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά.

Καρκινογένεση ορίζεται ως η διαδικασία γένεσης-δημιουργίας του καρκίνου. Η καρκινογένεση είναι ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας. Συνήθως αυτό προϋποθέτει και βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων λόγω έκθεσής τους σε κάποιους καρκινικούς παράγοντες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 80% των καρκίνων οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Hart, 2004). Αυτοί διαχωρίζονται σε αυτούς που ‘πυροδοτούν’ (initiate) και αυτούς που ‘προάγουν’ (promote) το σχηματισμό του όγκου. Οι καρκινογόνοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν επιγενετικές αλλαγές ή να επιφέρουν άμεσα ή έμμεσα αλλαγές του κυτταρικού γενοτύπου. (GENES VIII, Lewin, 2004)

Όλα ξεκινούν από την πορεία του κυτταρικού κύκλου η οποία ρυθμίζεται με ακρίβεια από τη δραστηριότητα πολλών γονιδίων που δημιουργούν ένα πολύπλοκο σύστημα ελέγχων και βιοχημικών ισορροπιών. Υπάρχουν σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) στα οποία ο κυτταρικός κύκλος σταματά αν ανιχνευτεί βλάβη στο γονιδίωμα ή στο μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου. Γενικά τα γονίδια που λαμβάνουν χώρα στον καρκίνο χωρίζονται σε δυο ομάδες, τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια υφίστανται ενεργοποίηση και είναι φαινοτυπικά κυρίαρχα ενώ τα ογκοκατασταλτικά υποβάλλονται σε αδρανοποίηση και είναι φαινοτυπικά υποτελή (Harrington, 2004). Η προσωρινή αδυναμία προόδου του κυτταρικού κύκλου επιτρέπει να επιδιορθωθεί έγκαιρα η βλάβη του γενετικού υλικού ή αν αυτό δεν είναι δυνατό, να πυροδοτηθεί η αυτοκαταστροφή του κυττάρου. Αυτές οι διεργασίες είναι απαραίτητες γιατί αποτρέπουν τα κύτταρα που φέρουν βλάβες να διαιρεθούν με μη προγραμματισμένο τρόπο, δηλαδή να γίνουν καρκινικά (i GENETICS, Russell, 2009).

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα, διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Ο καρκίνος είναι η αιτία για τη δημιουργία όγκων σε διάφορα σημεία του σώματος, όμως αυτή η ανώμαλη λειτουργία δεν πρέπει να συγχέεται με δυο φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού:

- Την αναγέννηση των ιστών που συμβαίνει όταν αφαιρείται ιστός και ο οργανισμός ξανά φτιάχνει τον ίδιο ιστό. Για παράδειγμα, στην καταστροφή των ηπατικών κυττάρων (αφαίρεση ήπατος) το ήπαρ αναγεννάται σε 6 μήνες.

- Την υπερπλασία που συμβαίνει λόγω της ανάγκης του οργανισμού να αναπτύσσει φυσιολογικούς ιστούς (π.χ. υπερπλασία του ενός νεφρού όταν υπάρχει έλλειψη του άλλου).

Οι όγκοι είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Γενικά, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα.

Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, παρόμοιους με αυτούς του αρχικού καρκίνου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μετάσταση. Οι κακοήθεις όγκοι συνήθως ταξινομούνται σε καρκινώματα (όγκοι που προέρχονται από το ενδόδερμα ή το εξώδερμα) και τα σαρκώματα (όγκοι προερχόμενοι από το μεσόδερμα). Οι λευχαιμίες είναι υποκατηγορία σαρκώματος που δεν αφορά συμπαγή όγκο, αλλά κύτταρα του αίματος. (Βιολογία του Καρκίνου, Κιτράκη και Τρούγκος, 2006) Τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται στο άτομο εξαρτώνται από το μέγεθος του όγκου, από τη θέση του στο σώμα, από το στάδιο ανάπτυξής του, από το αν έχει εισβάλει στους γειτονικούς ιστούς και σε ποια έκταση και από το αν έχει υπάρξει μετάσταση. Κάθε καρκίνος (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα, της μήτρας, του προστάτη κτλ.) έχει διαφορετικά συμπτώματα, διαφορετική εξέλιξη και επομένως αποτελεί διαφορετική ασθένεια.

Ο καρκίνος συνήθως δεν επηρεάζει μόνο ένα όργανο του σώματος και δεν έχει μία μορφή. Μπορεί να περιλαμβάνει οποιοδήποτε ιστό του σώματος και να έχει τελείως διαφορετική μορφή σε κάθε σημείο του σώματος. Υπάρχουν πάνω από 200 διαφορετικά είδη καρκίνου και δεν αντιμετωπίζονται όλοι με τον ίδιο τρόπο. Κάθε ένα είδος έχει τον δικό του τρόπο θεραπευτικής αντιμετώπισης. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες. Οι περισσότερες μορφές καρκίνου είναι στην ουσία όγκοι εκτός από ορισμένους τύπους καρκίνου όπως η λευχαιμία, των οποίων τα κύτταρα κυκλοφορούν μέσα στο αίμα και στα όργανα και τελικά αναπτύσσονται σε συγκεκριμένους ιστούς.

Έχουν πολλές φορές στο παρελθόν παρουσιασθεί οι μηχανισμοί και τα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν ένα κύτταρο να παρεκκλίνει της βιολογικής του

συμπεριφοράς και να γίνει καρκινικό και να δημιουργήσει έναν όγκο. Ένα στάδιο όμως μεταγενέστερο της καρκινογένεσης στη φυσική εξέλιξη της βιολογίας του όγκου χαρακτηρίζεται από ένα χρονικά κρίσιμο σημείο, το οποίο σχετίζεται με την ανάπτυξη νέων αγγείων (νεοαγγειογένεση) γύρω από τον όγκο.

Το σημείο αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς τα νέα αγγεία προμηθεύουν τον όγκο με σωρεία αυξητικών παραγόντων και τροφικών μηνυμάτων, σηματοδοτώντας μια νέα περίοδο της φυσικής του ιστορίας κατά την οποία ο όγκος αναπτύσσεται εκθετικά. Η αγγειογένεση είναι το αποτέλεσμα μιας καλά οργανωμένης δράσης των καρκινικών κυττάρων μέσω βιοχημικών παραγόντων προς τα φυσιολογικά κύτταρα, η οποία δημιουργεί τις συνθήκες ώστε τα φυσιολογικά κύτταρα να φτιάξουν στον όγκο τα νέα αγγεία και μάλιστα να τα κατευθύνουν προς τα καρκινικά κύτταρα του όγκου με χημειοτακτισμό.

Αυτό είναι το πιο χαρακτηριστικό γεγονός στη φυσική ιστορία της ανάπτυξης του όγκου. Όμως, με αναφορά στην κλινική πορεία της νόσου, το πλέον σημαντικό σημείο της είναι η στιγμή κατά την οποία ο όγκος μετατρέπεται από τοπική σε συστηματική νόσο. Όταν δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα φεύγουν από τον πρωτοπαθή όγκο και μέσω της κυκλοφορίας ή της λέμφου μεταναστεύουν σε άλλα ζωτικά όργανα μακριά από την αρχική τους εντόπιση, δημιουργώντας έτσι μακρινές αποικίες, τις μεταστάσεις.

Οι μεταναστευτικοί πληθυσμοί των κυττάρων οφείλουν να έχουν εκ των πραγμάτων ιδιαίτερα αυξημένες προσαρμοστικές ικανότητες, ώστε να αντεπεξέλθουν στις απαιτήσεις που επιβάλλει η διαδικασία μιας επιτυχημένης προσπάθειας μετανάστευσης. Δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα οφείλουν να λύουν τη συνέχεια του καρκινικού ιστού αποκτώντας ευκινησία, να διηθούν τους αυλούς των αγγείων και να μπαίνουν μέσα στα τριχοειδή αγγεία κοντά στον όγκο, να επιζήσουν κατά τη διάρκεια του μεταναστευτικού ταξιδιού τους στην κυκλοφορία ή μέσα στη λέμφο και τελικά να εγκατασταθούν σε συγκεκριμένα σημεία, δηλαδή σε ιστούς δεκτικούς σε «μετανάστες» όπως μη καλά φυλασσόμενους ιστούς, όπου πρέπει αρχικά να επιζήσουν στο νέο περιβάλλον και στη συνέχεια να προσαρμοστούν και να προοδεύσουν στους νέους κανόνες και συνθήκες διαβίωσης.

Τα μεταστατικά κύτταρα έχουν πλαστικότητα και δυνατότητα προσαρμογής πολύ μεγαλύτερη κι από εκείνη των κυττάρων που παραμένουν στον πρωτοπαθή όγκο. Μόνο καρκινικά κύτταρα με παρόμοιες ικανότητες μπορούν να γεννούν

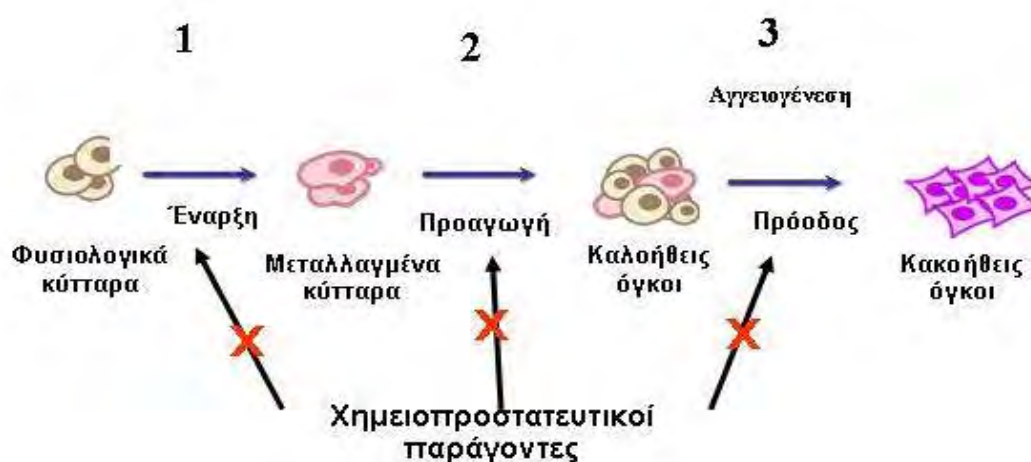
μεταστάσεις. Πρόκειται λοιπόν για ιδιαίτερα επιλεγμένες υπό-ομάδες καρκινικών κυττάρων. Γι' αυτό και η επιθετικότητα τους είναι κατά πολύ μεγαλύτερη.

Η διαδικασία όμως αυτή είναι συχνά ασυμπτωματική γι' αυτό και είναι πολύ δύσκολη η διάγνωσή της. Η χρονική περίοδος που περιλαμβάνει τη φάση της αγγειογένεσης στον πρωτοπαθή όγκο έως ότου διαπιστωθεί η παρουσία των μεταστάσεων, δηλαδή της παρουσίας μερικών εκατοντάδων χιλιάδων μεταναστευτικών κυττάρων σε νέες εστίες, όλη αυτή η περίοδος σήμερα αποτελεί ένα μαύρο κουτί, όπου κανείς δεν μπορεί να παρακολουθήσει τα διαδραματιζόμενα.

1.2.1 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης

Η κατανόηση της λειτουργίας του καρκίνου ως ασθένεια είναι ακόμη δύσκολη και ακόμη περισσότερο όταν τη μελετάμε σε επίπεδο οργανισμού όπου υπεισέρχονται πολλοί παράγοντες. Ο καρκίνος προκαλείται από παράγοντες τόσο εξωτερικούς(κάπνισμα, ακτινοβολία) όσο και εσωτερικούς (μεταλλάξεις, ορμόνες). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να δράσουν μαζί ή σταδιακά, ξεκινώντας και συνεχίζοντας την καρκινογένεση (Adhami and Mukhtar, 2006).

Με βάση αποτελέσματα πειραμάτων σε πειραματόζωα και πρόσφατες μελέτες της έρευνας των ογκογονιδίων, αποδείχθηκε ότι η καρκινογένεση δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου αλλά περιγράφεται από ένα πολυσταδιακό μοντέλο, (Cairns, 1975). Σύμφωνα με τη θεωρία του μοντέλου αυτού, η καρκινογένεση διαιρείται σε τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς (Κουρέτας, 2003):



Εικόνα 11. Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων.

1. Initiation (Εναρξη): στο πρώτο αυτό στάδιο έχουμε την πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγενήτορα (stem cell) (Potter, 1981). Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, προκαλείται μετάλλαξη σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να μπορεί να διαφοροποιείται, δίνοντας έτσι γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε, (Trosko and Chang , 1989).

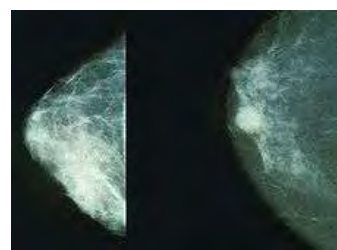
2. Promotion (φάση προαγωγής): ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο αυτό στάδιο είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων-μυημένων (initiated) κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων (promoters) που προάγουν τη μίτωση (Trosko et al., 1989), συνεπώς εμφανίζονται οι φαινοτυπικές ανωμαλίες. Το συγκεκριμένο στάδιο της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι αντιστρεπτό, εάν αποσυρθεί ο μιτογόνος παράγοντας. Καθώς το μυημένο (initiated) κύτταρο διαίρεται, όταν πλησιάζει στην κυτταρική διαίρεση στην οποία φυσιολογικά θα πέθαινε και παρόλα αυτά προχωρά και σε επόμενη κυτταρική διαίρεση προστίθενται βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων-απογόνων, οι οποίες κανονικά δεν θα συνέβαιναν αν τα κύτταρα είχαν πεθάνει στην κατάλληλη χρονική στιγμή, στην οποία ήταν καθορισμένο να πεθάνουν.

3. Progression (φάση προόδου): στο τρίτο στάδιο εμφανίζονται οι γενετικές ανωμαλίες που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο (Hennings et al., 1983). Το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο μετατρέπεται σε ένα ανεξάρτητο καρκινικό κύτταρο.

1.2.2 Καρκίνος του μαστού

Ο όρος ‘καρκίνος του μαστού’ αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στους γαλακτοπαραγωγούς αδένες του μαστού ή στους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα. Διακρίνονται διαφορετικοί τύποι.

Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων που ως αποτέλεσμα προκαλούν το σχηματισμό ενός κακοήθους όγκου στην περιοχή του



Εικόνα 12. Εικόνα μαστογραφίας: αριστερά φυσιολογικός μαστός και δεξιά μαστός με καρκίνο.

μαστού και ουσιαστικά αποτελεί κυτταρική νόσο. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς σε δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό.

Αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στο γυναικείο πληθυσμό. Είναι ένα από τα είδη καρκίνου που επιφέρουν τους περισσότερους θανάτους ετησίως (519.000 θανάτους το 2004). Όσον αφορά στις γυναίκες όλες αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου – όχι, όμως στον ίδιο βαθμό. Παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια στους άνδρες, με περίπου 100 φορές μικρότερη συχνότητα συγκριτικά με τις γυναίκες και τα ίδια ποσοστά επιβίωσης.

Ανιχνεύεται με τη μέθοδο της **μαστογραφίας**. Οι θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν **χειρουργική επέμβαση, ορμονοθεραπεία, χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία**. Τα τελευταία ευτυχώς χρόνια οι θάνατοι από τον καρκίνο του μαστού έχουν μειωθεί αρκετά λόγω της γρήγορης ανίχνευσης και την πρόοδο στις θεραπευτικές τεχνικές (Boulaiz et all, 2011)

Επιστημονικά στοιχεία δείχνουν ότι το ένα τρίτο των καρκίνων που εμφανίζονται σχετίζεται με τη διατροφή, την παχυσαρκία και την έλλειψη φυσικής άσκησης, κάτι που μπορούσε να αποφευχθεί (Jermal et all, 2006). Τα οιστρογόνα επίσης πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού καθώς εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στους αδένες του μαστού (Sturgeon and Ronnenberg, 2010).

1.2.2.1 Ανατομία του στήθους

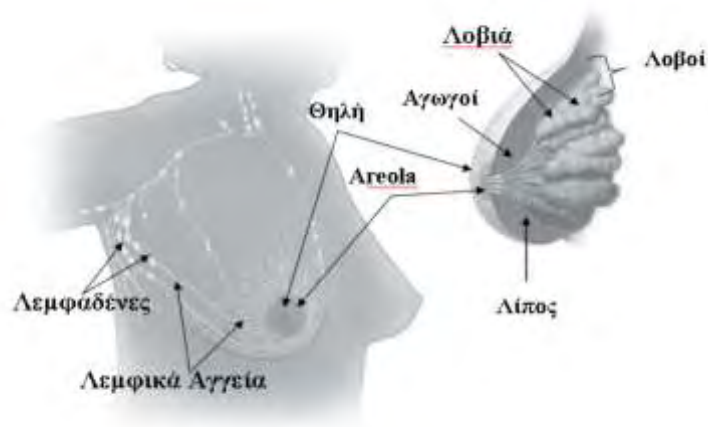
Εσωτερικά το στήθος αποτελείται από 15 με 20 τομείς η οποίοι λέγονται λοβοί. Άλλα δομικά στοιχεία είναι τα λοβιά, οι αγωγοί, οι αδένες, τα λεμφικά αγγεία, οι λεμφαδένες και ένας λιπαρός, ινώδης ιστός που περιβάλλει το χώρο μεταξύ λοβών και αγωγών. Ο καρκίνος ξεκινά από τα κύτταρα, το δομικό στοιχείο των ιστών. Υγιή κύτταρα μεγαλώνουν και αναπτύσσονται για να δημιουργήσουν νέα κύτταρα που χρειάζεται ο οργανισμός. Όταν τα υγιή κύτταρα μεγαλώσουν, γεράσουν και καταστραφούν, πεθαίνουν και καινούρια κύτταρα παίρνουν τη θέση τους. Μερικές φορές όμως αυτή η διαδικασία, κάτι συμβαίνει και δεν ολοκληρώνεται σωστά.

Σχηματίζονται νέα κύτταρα χωρίς ο οργανισμός

πραγματικά να τα χρειάζεται ή παλιά και γερασμένα κύτταρα δεν πεθαίνουν όπως θα έπρεπε. Ο

σχηματισμός αυτός των νέων κυττάρων δημιουργεί μία μάζα

που ονομάζεται λέμφος ή όγκος. Ο όγκος μπορεί να είναι καλοήθης (δεν είναι και τόσο επικίνδυνος) ή κακοήθης.



Εικόνα 13. Ανατομία στήθους

Από την ανάλυση του DNA μελών οικογενειών με οικογενή καρκίνο του μαστού εντοπίστηκαν αρχικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα δύο γονίδια, που συνδέονται αιτιολογικά με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού και σε μικρότερο βαθμό με τον καρκίνο των ωοθηκών:

α) Το γονίδιο BRCA1, το οποίο εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 (17q21), αποτελείται από 22 εξόνια και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1.863 αμινοξέα.

β) Το γονίδιο BRCA2, που βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13 (13q12), αποτελείται από 27 εξόνια και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 3.418 αμινοξέα. (Ζαφράκας et al., 2009)

1.2.2.2 Στατιστικά στοιχεία

Σύμφωνα με τη Διεθνή Έκθεση για τις καρκινικές νόσους που παρουσιάστηκε στη Γενεύη της Ελβετίας τον Απρίλιο του 2003 από την IARC (International Agency for Research on Cancer), ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών, με περίπου 1.000.000 νέα κρούσματα παγκοσμίως. Ορισμένοι αριθμοί δίνουν τη κοινωνική διάσταση του καρκίνου του μαστού. Στις ΗΠΑ κάθε χρόνο περισσότερες από 192.000 περιπτώσεις γυναικών διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού ενώ μόνο το 2004 οι νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού

στις γυναίκες ήταν 217.000 περίπου. Για το 2008 υπολογίζεται ότι 182.460 καινούριες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού θα διαγνωσθούν στις ΗΠΑ από τις οποίες οι 40.480 θα καταλήξουν σε θάνατο (Sturgeon and Ronnenberg, 2010). Στην Ελλάδα αναφέρονται 4.500 περίπου νέες περιπτώσεις το χρόνο, ενώ υπολογίζεται ότι 1 στις 8 γυναίκες παγκοσμίως θα παρουσιάσει καρκίνο μαστού σε κάποια φάση της ζωής της. Στην Ευρώπη, το 60% των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού διαγιγνώσκεται σε πρώιμο στάδιο. Το αντίστοιχο ποσοστό στην Ελλάδα είναι μόλις 5%. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν πόσο ελλιπής είναι η σχετική ενημέρωση μεταξύ των Ελληνίδων.

Τα ποσοστά θανάτου από καρκίνο του μαστού χαρακτηρίζονται από πτωτική τάση από τις αρχές του 1990, με τις μεγαλύτερες μειώσεις να εντοπίζονται στις γυναίκες κάτω των 50. Οι ερευνητές αποδίδουν την πτώση αυτή στην έγκαιρη διάγνωση μέσω μαστογραφιών καθώς και στις βελτιώσεις που έχουν επέλθει στις σχετικές θεραπευτικές αγωγές. Ο αριθμός των ατόμων που έχουν αντιμετωπίσει με επιτυχία τον καρκίνο του μαστού αυξάνεται συνεχώς - από τον Ιανουάριο του 2006, υπήρξαν περίπου 2,5 εκατομμύρια γυναίκες στις ΗΠΑ που, βάσει της έκθεσης, έχουν ξεπεράσει με επιτυχία την περιπέτεια του καρκίνου του μαστού.

1.2.2.3 Αίτια

Δυστυχώς, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με τα αίτια που προκαλούν καρκίνο του μαστού, παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί αρκετοί παράγοντες κινδύνου. Το ότι μια γυναίκα είναι εκτεθειμένη σε έναν παράγοντα κινδύνου δεν σημαίνει ότι θα παρουσιάσει καρκίνο αλλά και να μην είναι εκτεθειμένη σε κανέναν από αυτούς, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν θα νοσήσει. Οι παράγοντες κινδύνου αναφέρονται παρακάτω:

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Ηλικία | 8. Ιστορικό Καρκίνου |
| 2. Κληρονομικότητα | 9. Καθιστική Ζωή |
| 3. Διαταραχές της έμμηνου ρύσης | 10. Έκθεση σε ακτινοβολία |
| 4. Αλκοόλ | 11. Ατεκνία |
| 5. Παχυσαρκία | 12. Θεραπεία Ορμονικής |
| 6. Κάπνισμα | Υποκατάστασης |
| 7. Λήψη αντισυλληπτικών χαπιών | |

1.2.2.4 Συμπτώματα

Κάποια από τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού είναι τα εξής:

- Εξόγκωμα ή σκλήρυνση στην περιοχή του μαστού ή και της μασχάλης
- Διόγκωση λεμφαδένων της μασχάλης
- Έκκριση υγρών από τη θηλή
- Εισολκή δέρματος δηλαδή έλξη του δέρματος ή της θηλής προς το εσωτερικό του μαστού
- Ερυθρότητα, ευαισθησία ή πόνοι στο στήθος



Εικόνα 14. Κύρια συμπτώματα του καρκίνου του μαστού.

1.2.2.5 Μοριακοί προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού

Οι προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού επιτρέπουν τον υπολογισμό της πιθανότητας επανεμφάνισης της νόσου μετά την πρωτογενή θεραπεία, είτε με τη μορφή τοπικής ή περιοχικής υποτροπής είτε με τη μορφή απομακρυσμένης ή απομακρυσμένων μεταστάσεων, καθώς επίσης και την πιθανότητα θανάτου από τη νόσο. Με άλλα λόγια, οι προγνωστικοί παράγοντες από τη χρονική στιγμή που τίθεται η αρχική διάγνωση παρέχουν πληροφορίες για την επιθετικότητα της νόσου και τους κινδύνους που αυτή ενέχει για την ασθενή στο μέλλον.

Εδραιωμένοι κλινικοί προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού θεωρούνται το μέγεθος του πρωτογενούς όγκου, η διασπορά ή όχι στους λεμφαδένες της μασχάλης ή της έσω μαστικής αρτηρίας, ο ιστομορφολογικός τύπος του πρωτογενούς όγκου, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης (grading) και η διήθηση αιμοφόρων αγγείων ή λεμφαγγείων κατά την αρχική μικροσκοπική εξέταση του πρωτογενούς όγκου. Τελευταία, στους κλινικούς προγνωστικούς παράγοντες προστέθηκε και ο βαθμός ανταπόκρισης του πρωτογενούς όγκου στη χορήγηση προ-εγχειρητικής (neoadjuvant) κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας, (Ζαφράκας et al., 2009).

1.2.2.6 Διάγνωση

Ο καρκίνος του μαστού δεν προλαμβάνεται ακόμα πρωτογενώς διότι δεν γνωρίζουμε ακόμα τον παράγοντα δημιουργίας του αλλά δευτερογενώς με έγκαιρη διάγνωση, πρόληψη και θεραπεία. Η δευτερογενής πρόληψη περιλαμβάνει αυτοεξέταση, κλινική εξέταση από ιατρό και μαστογραφία. Η διάγνωση ξεκινά όταν ανακαλυφθεί μια μάζα στο μαστό μετά από ψηλάφηση



Εικόνα 15. Εικόνα μαστογραφίας.

ή **μαστογραφία** ή υπέρηχο και στη συνέχεια ακολουθούν εξετάσεις ώστε να διευκρινιστεί η διαφορά ανάμεσα σε ένα συμπαγή όγκο και μια κύστη γεμάτη υγρό. Υπάρχουν 4 διαγνωστικές μέθοδοι:

1. **Κυτταρολογική βιοψία**
2. **Ιστολογική βιοψία**
3. **Στερεοτακτική βιοψία**
4. **Ανοιχτή χειρουργική βιοψία**

1.2.2.7 Μετάσταση

Υπάρχουν τρεις τρόποι που ο καρκίνος μπορεί να μεταφερθεί και να μολύνει και άλλα όργανα του σώματος.

- Μέσω των ιστών. Ο καρκίνος εισβάλλει και στους υπόλοιπους ιστούς που γειτνιάζουν με αυτόν.
- Μέσω του λεμφικού συστήματος. Ο καρκίνος εισβάλλει στους λεμφαδένες και μεταφέρεται μέσω των αγγείων στα υπόλοιπα μέρη του σώματος.
- Μέσω του αίματος. Ο καρκίνος εισβάλλει στις φλέβες και στα τριχοειδή και μεταφέρεται μέσω του αίματος και σε άλλα σημεία του σώματος.

1.2.2.8 Θεραπεία

Το αρχικό βήμα για την αντιμετώπιση της νόσου είναι η χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση του όγκου και διατήρησης του μαστού. Αυτές μπορεί να είναι δύο ειδών: με αφαίρεση σβώλου ή μερική μαστεκτομή. Άλλοι τύπου χειρουργικών επεμβάσεων είναι τα εξής: ολική μαστεκτομή ή τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή

Στη συνέχεια η μετεγχειρητική θεραπεία μπορεί να περιλαμβάνει **Ακτινοθεραπεία, Χημειοθεραπεία, Ορμονοθεραπεία**. Τα στοιχεία που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή της μετεγχειρητικής θεραπείας είναι το μέγεθος και η διαφοροποίηση του όγκου, η ύπαρξη ορμονικών υποδοχέων, το αποτέλεσμα της εξέτασης του Her2/neu και η γενική κατάσταση της υγείας.

1.2.2.9 Καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού

Δεν είναι όλες οι αλλοιώσεις, διογκώσεις ή σκληρύνσεις καρκινικές και κακοήθεις. Υπολογίζεται πως το 90% των μαστικών όγκων σε γυναίκες ηλικίας 20 – 50 ετών προκαλούνται από κάποια πάθηση καλοήθους φύσης.

Οι καλοήθεις παθήσεις μπορούν να είναι:

- | | |
|--------------|--------------------|
| ▪ Ινοαδένωμα | ▪ Λίπωμα |
| ▪ Κύστη | ▪ Φυλλοειδής όγκος |

- Θήλωμα
- Φλεγμονή-Απόστημα
- Ινοκυστική μαστοπάθεια
- Γαλακτοφορεκτασία
- Μασταλγία
- Μαστίτιδα
- Γαλακτοκίλη
- Αδεονόλιπωμα

Οι κακοήθεις παθήσεις μπορούν να είναι:

- Επί τόπου Πορογενές Καρκίνωμα (Ductal carcinoma in situ [DCIS])
- Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα (Invasive Ductal Carcinoma [IDC])
- Σωληνώδες Καρκίνωμα του μαστού (Tubular carcinoma)
- Μυελώδες Καρκίνωμα στο στήθος
- Βλεννοπαράγωγο Μαστικό Καρκίνωμα
- Θηλώδες (Θηλοειδές) Καρκίνωμα στο μαστό (Papillary Carcinoma of the Breast)
- Διάτρητο Καρκίνωμα του Μαστού (Cribriform Carcinoma of the Breast)
- Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα (Invasive lobular carcinoma [ILC])
- Φλεγμονώδης Καρκίνος του Μαστού (Inflammatory breast cancer)



1.2.3 Χημειοπροφύλαξη

Ο όρος Χημειοπροφύλαξη εισήχθη για πρώτη φορά από τον Sporn το 1976 και ορίζεται η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογένεσης μέσω της χορήγησης χημικών ενώσεων είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε ως συστατικά των φυτικών τροφών.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η χημειοπροφύλαξη διαφέρει από την πρόληψη μιας και η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή των συνηθειών (καλύτερη διατροφή, άσκηση, αποφυγή καπνίσματος) του ατόμου. Από την άλλη η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση χαπιών ή συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία περιέχουν βιοδραστικά, μη θεραπευτικά συστατικά φυτικής προέλευσης τα οποία ονομάζονται **φυτοχημικά συστατικά**.

Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου. Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν πως υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Αυτό μπορεί να γίνει με κάποιον χημειοπροστατευτικό παράγοντα.

Σύμφωνα με τον Wattenberg (1985) οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους:

- 1) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου
- 2) Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου, οι οποίοι αναστέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογένεσης
- 3) Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική φάση (progression) της καρκινογενετικής διαδικασίας

1.2.3.1 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η βιοδιαθεσιμότητά τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό κ.α. (Κουρέτας 2003, De Flora & Ferguson, 2005, Kelloff, et al, 2005).

A) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Είναι ενώσεις που έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Συνήθως δρουν αναστέλλοντας το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν χημικές ενώσεις όπως:

- 1) Τα αναγωγικά οξέα, π.χ. το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
- 2) Οι φυτικές πολυφαινόλες, π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ
- 3) Οι σουλφωδρυλικές ενώσεις, π.χ. N-ακετυλκυστεΐνη
- 4) Τα αμινοξέα, όπως προλίνη και θειοπρολίνη που δεσμεύουν τα νιτρώδη σχηματίζοντας μη μεταλλαξιγόνες νιτροζαμίνες.

B) Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου δρουν κατά την πρώτη φάση της καρκινογένεσης και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες :

- 1) Αναστολείς του κυτοχρώματος P450: τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, στην οποία ανήκουν και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μπορεί να μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Έτσι, ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του P450 θεωρείται ότι μπορούν να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση. Τέτοιες ουσίες είναι οι δισουλφιράμη, το ελλαγικό οξύ και οι ισοθειοκυανικές ενώσεις.
- 2) Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών: οι ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II δρουν κυρίως ως αντικαρκινικοί παράγοντες γιατί αυξάνουν την διαλυτότητα και την απέκκριση των ξενοβιοτικών ουσιών. Σημαντικά ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών είναι η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η τρανσφεράση του UDP γλυκουρονικού. Τέτοιες ενώσεις είναι η σουλφοραφάνη και η BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη).
- 3) Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών: οι βλάβες στο DNA των κυττάρων προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονιοφιλικών 'τελικών' καρκινογόνων ή των διαφόρων ελευθέρων ριζών με το DNA. Η εξουδετέρωσή τους αποτελεί βασικό μηχανισμό της χημειοπροφυλακτικής δράσης αρκετών ουσιών.
- 4) Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA: πρόκειται για ένζυμα ή και φυσικές ουσίες που αυξάνουν την ικανότητα της αποκατάστασης των

βλαβών του DNA ή εμπλέκονται στους μηχανισμούς αποκατάστασης. Αυτά τα ένζυμα δρουν με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς:

- i) Αυξάνοντας το συνολικό επίπεδο επιδιόρθωσης βλαβών του DNA.
- ii) Αναστέλλοντας τη δράση του επιδιορθωτικού ενζύμου πολύ(ADP-ριβοςυλ) τρανσφεράση (ADPRT). Υπάρχουν χημειοπροστατευτικές ενώσεις που παρεμποδίζουν αυτή την αναστολή.
- iii) Καταστέλλοντας το μηχανισμό επιδιόρθωσης που έχει τάση για λάθη στο DNA (error-prone DNA repair).

Γ) Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

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

- 1) Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυαμινών που συχνά είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Υπάρχουν παράγοντες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το μεταβολισμό των πολυαμινών.
- 2) Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η μη διαφοροποίησή τους. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang et all, 1986, Sani et all, 1990).
- 3) Ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα ενδιάμεσα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης με σκοπό την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C συμβάλλοντας έτσι σε καταστολή της καρκινογένεσης (Kelloff GJ, et all, 1997).
- 4) Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων. Εδώ μπορεί να έχουμε μια πιο άμεση αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας ορμονών και αυξητικών παραγόντων που γίνεται επεμβαίνοντας στους υποδοχείς τους στην κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη. Σχετικό παράδειγμα είναι τα αντι-οιστρογόνα (π.χ. ταμοξιφαίνη) που συνδέονται με τους πυρηνικούς

υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας έτσι την σύνδεση και προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan VC, 1992).

- 5) Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων. Μεγάλο κομμάτι της έρευνας σχετικά με την ανασταλτική δράση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων έναντι των ογκογονιδίων έχει εστιαστεί στο ογκογονίδιο *ras*, η ενεργοποίηση του οποίου προϋποθέτει τη φαρνεσυλίωσή του. Η ουσία D-λιμονίνη που υπάρχει στα κίτρα, αναστέλλει την πρόοδο των όγκων του μαστού αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson et all, 1998).
- 6) Επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων που συμβάλλουν στην επικοινωνία μεταξύ τους. Αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στους όγκους. Ουσίες όπως το ρετινοϊκό οξύ, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο που προάγουν την διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Zhang et all, 1991, Κουρέτας Δ, 2003).
- 7) Επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης. Υπάρχουν χημειοπροστατευτικοί παράγοντες που έχουν επαγωγικές δράσεις της ανοσολογικής απόκρισης. Σχετικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη Ε που σε κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων και το ρετινοϊκό οξύ που συμβάλλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers-NK) (Hill DL and Grubbs CJ., 1992).
- 8) Επαγωγείς της απόπτωσης. Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Νακοπούλου Α, Μιχαλοπούλου Α., 1997). Διαταραχή αυτής της ομοιόστασης μπορεί να έχει σοβαρές παρενέργειες όπως η καρκινογένεση. Παράδειγμα επαγωγέα της απόπτωσης είναι το τριοξειδίο του αρσενικού που επάγει την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα. Αυτό ενεργεί άμεσα επί της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου εξαλείφοντας το δυναμικό αυτής και οδηγώντας στην αναστολή της έκφρασης του Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3. Χορηγείται για την αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Zhu J et all, 2002).
- 9) Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA. Η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού. Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν ως δότες μεθυλομάδων.

- 10) Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και ένζυμα που συντελούν στη λύση της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεάσες (ελαστάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών σε κάποιο ποσοστό οφείλεται στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης (Kennedy AR., 1998).
- 11) Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ανάμεσα στα άλλα που λαμβάνουν χώρα κατά τη φάση προαγωγής της καρκινογένεσης συμβαίνει και αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος που συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας Δ, 2003). Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών παράγονται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με μελέτες αναστολείς των κυκλοοξυγενασών (αντιφλεγμονώδη φάρμακα και φυτικές πολυφαινόλες) δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Reddy BS et all, 1987). Επιπροσθέτως αναστολείς της λιποξυγενάσης (π.χ. βιταμίνη E) αναστέλλουν την φάση προαγωγής της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών (Huang MT et all, 1991).

1.2.4 Καρκινική σειρά MCF-7

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία χρησιμοποιήσαμε την καρκινική σειρά MCF-7. Αυτά τα κύτταρα έχουν απομονωθεί από καρκίνο του μαστού μιας καυκάσιας γυναίκας 69 ετών, το 1970. Το όνομα της ασθενούς ήταν Frances Mallon και χάριν σε αυτήν και τα κύτταρά της έχουμε όση γνώση έχουμε γύρω από τον καρκίνο του μαστού (Soule et al, 1973; Levenson and Jordan, 1997). Το ακρωνύμιο MCF-7 αναφέρεται στο Michigan Cancer Foundation – 7, ενός ινστιτούτου στο Ντιτρόιτ όπου έγινε και η απομόνωσή τους το 1973 από τον Herbert Soule και τους συνεργάτες του (Soule et al, 1973). Πριν από αυτή την κυτταρική σειρά, δεν ήταν δυνατό για τους επιστήμονες να διατηρήσουν μια κυτταρική σειρά που θα μπορούσε να ζήσει περισσότερο από μερικούς μήνες (Glodek and Cass, 1990).

Ο αρχικός όγκος από τον οποίο προήλθαν ήταν διηθητικό, πορώδες καρκίνωμα από τον υδροθώρακα. Επίσης, έχουν παρουσία υποδοχέων οιστρογόνου και προγεστερόνης, αποκρίνονται στα οιστρογόνα, δεν ενισχύουν το γονίδιο ERBB2, προκαλούν όγκο στα ποντίκια με την ενίσχυση οιστρογόνων και έχουν φαινότυπο οφθαλμικού επιθηλίου (Levenson and Jordan, 1997, Lacroix and Leclercq, 2004, Ross and Perou, 2001, Charafe-Jauffret, et al, 2006, Lacroix et al, 2006).



Εικόνα 16. Καρκινικά κύτταρα MCF-7

1.2.5 Φυτοχημικά συστατικά

Ο όρος βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Bidlack et al, 2000; Meskin et al, 2002). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris - Etherton et al, 2002; Valko et al, 2007). Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές/ φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlack et al, 2000).

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Στο φυτικό βασίλειο έχουν ταυτοποιηθεί πολλές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή. Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι τα φυτοχημικά συστατικά που έχουν μελετηθεί περισσότερο από τους επιστήμονες για τις βιολογικές τους ιδιότητες. Υπάρχουν σε πληθώρα φυτικών προϊόντων και είναι αυτές που τους προσδίδουν το χρώμα, τα γευστικά χαρακτηριστικά και το έντονο χρώμα τους. Υπάρχουν στα περισσότερα φρούτα, στα λαχανικά, στα βότανα, στα ψυχανθή, στα δημητριακά, στο τσάι, στο κόκκινο κρασί κ.α. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν, (Kris - Etherton, PM, et al, 2002).

Οι πολυφαινόλες, που αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2000)

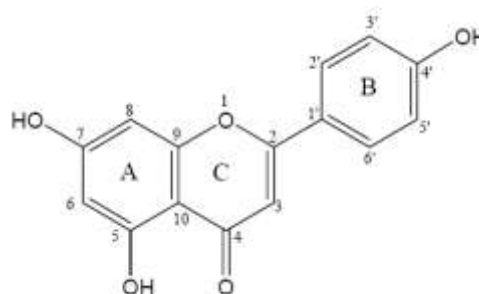
Οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μιας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη ή κάποιο άλλο σάκχαρο. Σχετικά με τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια αφού άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες

κατηγορίες με βάση τη χημική δομή τους, δηλαδή αναλόγως του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριό τους και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Έτσι οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα μη φλαβονοειδή χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια και τις λιγνάνες (Vermeris and Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006). Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν τις ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινόλων στη μείωση του ρίσκου για χρόνιες ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Επίσης έχειδειχθεί ότι φλαβονοειδή όπως η κερσετίνη στα μήλα, η επιγαλοκατεχίνη στο πράσινο τσάι και η γενιστεΐνη στη σόγια επάγουν την απόπτωση. Σε μοριακό επίπεδο τα φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ότι διαμορφώνουν έναν αριθμό βασικών στοιχείων στην κυτταρική μεταγωγή σήματος που συνδέονται με την αποπτωτική διαδικασία (κασπάσες και Bcl-2 γονίδιο) (Ramos, 2007).

Α) Φλαβονοειδή

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6 – C3 – C6).

Τα περισσότερα φλαβονοειδή βρίσκονται στην φύση κυρίως με την μορφή γλυκοζιδίων. Τα σάκχαρα είναι συνήθως συνδεδεμένα με τις υδροξυλικές ομάδες που βρίσκονται στον Α δακτύλιο της δομής των φλαβονοειδών, ωστόσο πιο συχνά το σάκχαρο είναι συνδεδεμένο με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα που βρίσκεται στην θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου. Ανάλογα με το σάκχαρο που συμμετέχει διαφοροποιούνται και οι ιδιότητές τους (Andersen & Markham, 2006).



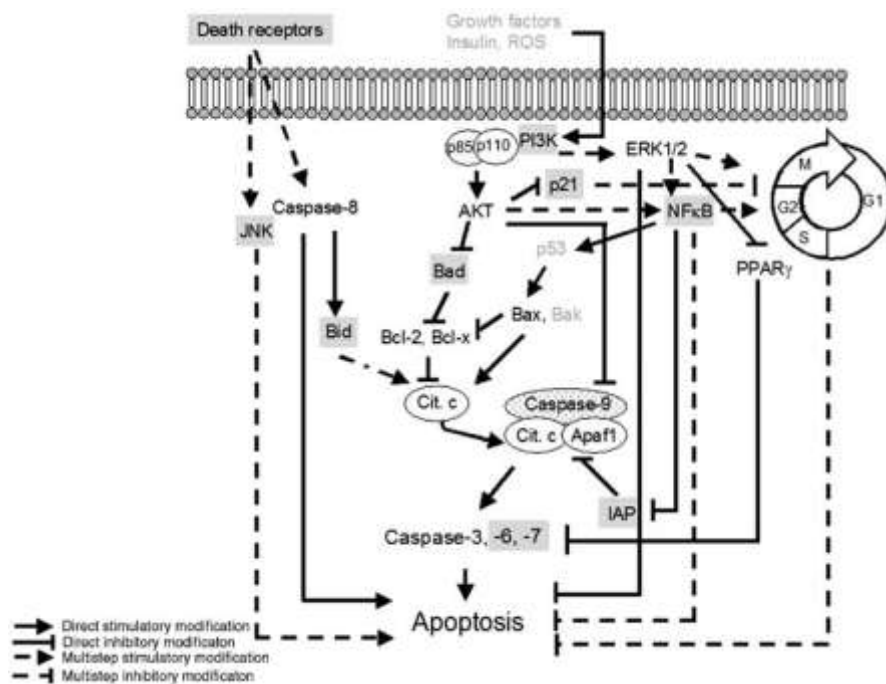
Εικόνα 17. Βασικός ανθρακικός σκελετός της χημικής δομής των φλαβονοειδών.

Καθώς είναι από τις πιο συχνές ενώσεις φυτοχημικών που συναντώνται στη φύση, τα φλαβονοειδή έπειτα από πολλές έρευνες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι δρουν ως αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες, όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Cheynier, 2005).

Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες:

- 1) φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη)

- 2) φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη)
- 3) φλαβόνες (λουτεολίνη, απιγενίνη, χρυσίνη)
- 4) φλαβανόνες (ναριγενίνη)
- 5) ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη, ντετζεΐνη που βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και
- 6) ανθοκυανιδίνες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη) (Manach et al., 2004)



Εικόνα 18. Τα φλαβονοειδή αντιδρούν με ένα μεγάλο εύρος μορίων που συμπεριλαμβάνονται στην απόπτωση και στα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιδρώντας στην έκφρασή του ή στην ενεργοποίησή τους. Στο διάγραμμα συνοψίζονται όλα στα στοιχεία που των δύο αυτών μονοπατιών τα οποία έχει αναφερθεί ότι επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή αλλά αυτό δε σημαίνει ότι αυτά είναι άμεσοι στόχοι αυτών των διατροφικών στοιχείων. Με μαύρα γράμματα είναι αυτά τα στοιχεία που προκαλούν αλλαγές κοινές σε όλα τα επιλεγμένα φλαβονοειδή, με μαύρα γράμματα σε γκρι πλαίσιο είναι τα στοιχεία με τα οποία παρατηρήθηκαν αλλαγές σε δύο φλαβονοειδή και με γκρι γράμματα είναι οι στόχοι που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος αλλά δεν αναφέρεται ότι ρυθμίζουν οποιοδήποτε φλαβονοειδές. (Ramos, 2007)

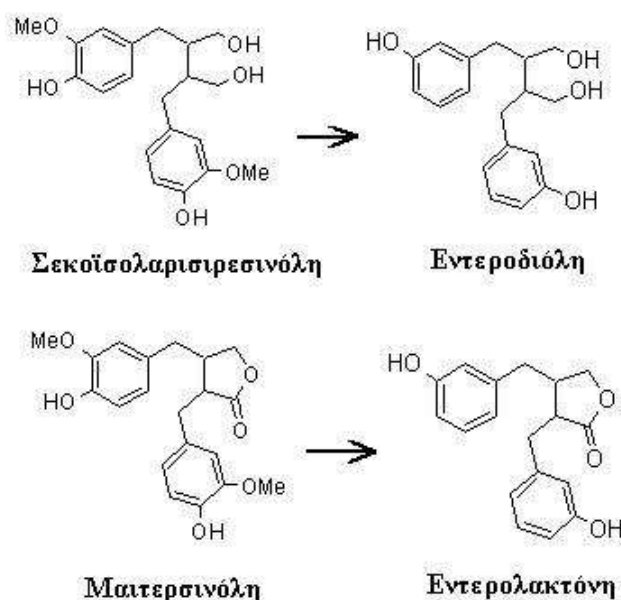
B) Μη Φλαβονοειδή

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

- 1) **Στα φαινολικά οξέα:** Τα φαινολικά οξέα έχουν την πιο απλή δομή από τα φλαβονοειδή γιατί αποτελούνται από έναν αρωματικό, βενζοϊκό δακτύλιο. Μπορούμε να τα διακρίνουμε στα

- i) υδροξυβενζοϊκά (C6-C1), παράγωγα του βενζοϊκού οξέως, π.χ. το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ
- ii) και τα υδροξυκινναμικά οξέα (C6-C3), παράγωγα του κινναμικού οξέως, π.χ. το καφεϊκό, το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ

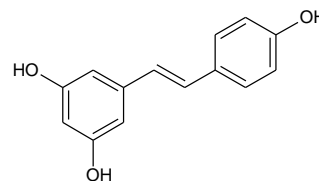
2) **Στα λιγνάνια:** Τα λιγνάνια σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένα με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. . Οι κύριες φυτικές λιγνάνες είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, οι οποίες μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα στις λιγνάνες των θηλαστικών εντεροδιόλη και εντερολακτόνη αντίστοιχα. Κύρια πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος.



Εικόνα 19. Χημική δομή της σεκοϊσολαρισιρεσινόλης και της ματαιρεσινόλης και των αντίστοιχων λιγνάνων των θηλαστικών.

3) **Στα στυλβένια:** Η χημική δομή τους αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μία γέφυρα μεθυλενίου. Τα στυλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά την διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Τα στυλβένια διαφέρουν ως προς την θέση και τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με τους αρωματικούς δακτυλίους, ως προς τον βαθμό κατά τον οποίο οι ομάδες αυτές συνδέονται με σάκχαρα,

μεθυλομάδες και μεθοξυλομάδες. Διαφέρουν ακόμη και ως προς τη στερεοχημική τους διαμόρφωση στο χώρο και ως προς την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις για τον σχηματισμό πολυμερών (Crozier et al, 2006; Manach et al, 2004).



Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al, 1998).

Εικόνα 20. Χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης.

1.3 Ελεύθερες ρίζες και καρκινογένεση

Οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται με διάφορους μηχανισμούς με την καρκινογενετική διαδικασία (Klaunig and Kamendulis, 2004). Όπως προαναφέρθηκε βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων. Παρότι οι μεταλλάξεις στο πυρηνικό DNA σχετίζονται κυρίως με την καρκινογένεση, και το μιτοχονδριακό DNA είναι ευπαθές σε μεταλλάξεις από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι μεταλλάξεις και η τροποποίηση της λειτουργικότητας του μιτοχονδριακού γενώματος είναι ένας ακόμη μηχανισμός της καρκινογενετικής δράσης των ελευθέρων ριζών (Cavalli and Liang, 1998; Klaunig and Kamendulis, 2004).

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν και σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Είναι υποπροϊόντα της κυτταρικής οξειδωτικής διαδικασίας και παράγονται μέσα στα μιτοχόνδρια ή από άλλες πηγές. Προκαλούν επίσης βλάβες στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA (Orrenius, 1993). Έχει προταθεί ότι οι ROS ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κατά το στάδιο της προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας (Slater et al, 1995; Burdon, 1995; Cerutti, 1985). Η ιδιότητα αυτή είναι αρκετά περίπλοκη και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της απόπτωσης ή νέκρωσης των κυττάρων ενώ η χαμηλή συγκέντρωσή τους επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια, τη γονιδιακή έκφραση όπως την ενεργοποίηση

μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Klaunig and Kamendulis, 2004; Das, 2002).

Ωστόσο, η επαγωγή της απόπτωσης με τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών, αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό απέναντι στην καρκινογενετική διαδικασία (Das, 2002; Hail et al, 2008). Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα οδηγούν στην απόπτωση και στον κατακερματισμό του DNA μέσω ελευθέρων ριζών (Hadi et al, 2007; Hail et al, 2008). Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι πολυφαινολικές ενώσεις επάγουν την απόπτωση δεν είναι πλήρως γνωστός (Ramos, 2007; Sun et al, 2004). Ένας ακόμη προτεινόμενος μηχανισμός, ο οποίος εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης, εμπεριέχει τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών. Οι ROS που παράγονται μέσω της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών μπορούν να οδηγήσουν στον κατακερματισμό του DNA και στην απόπτωση. Έτσι οι πολυφαινόλες μέσω της προοξειδωτικής τους δράσης μπορούν να οδηγήσουν στην επαγωγή της απόπτωσης, δρώντας χημειοπροστατευτικά (Hadi et al, 2000; Ramos, 2007).

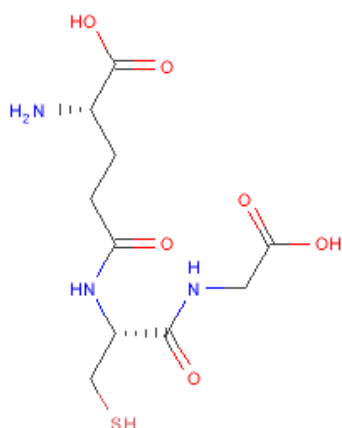
1.4 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη, ένα τριπεπτίδιο (γ -Glu-Cys-Gly), και υπάρχει στην ανηγμένη (GSH) και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) στα κύτταρα (Meister and Anderson, 1983). Η GSSG μετά το σχηματισμό της από την GPx ανάγεται σε GSH μέσω της δράσης του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

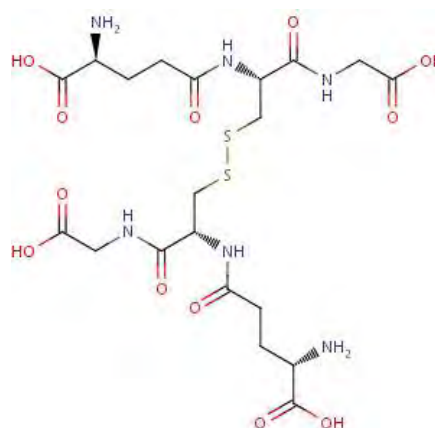
Στα κύτταρα η συγκέντρωση της GSH είναι 10 ή 100 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της GSSG. Αύξηση της ενδοκυτταρικής GSSG οφείλεται στην αποικοδόμηση του H_2O_2 από την GPx. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, ακόμη και μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al, 1988).

Ακόμη, η δραστηριότητα και τα επίπεδα έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς και οι μεταβολές στο σύστημα της γλουταθειόνης αποτελούν έναν από τους δείκτες του οξειδωτικού στρες (Therond et al, 2000). Ο λόγος GSH/GSSG θεωρείται πολύ σημαντικός δείκτης εκτίμησης του οξειδωτικού στρες. Όπως προαναφέρθηκε ακόμη και μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG. Επειδή ο λόγος της συγκέντρωσης της GSH και της

GSSG στα κύτταρα βρίσκεται σε ισορροπία, μια διαταραχή οφείλεται είτε σε μείωση της συγκέντρωσης της GSH είτε σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al., 1988). Ωστόσο η ισορροπία του οξειδοαναγωγικού συστήματος της γλουταθειόνης μπορεί να διατηρηθεί ακόμη και σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες με την αύξηση της δράσης της GR (Schafer and Buettner, 2001).



Εικόνα 21. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)



Εικόνα 22. Οξειδωμένη Γλουταθειόνη, GSSH

1.5 Απόπτωση

Η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι βασική προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία ενός ιστού και την αποφυγή της υπερπλασίας ή της εκφύλισής του, ως επακόλουθο υπέρμετρης ή ελλειμματικής κυτταρικής αύξησης, αντίστοιχα. Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η διεργασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης, με την οποία στους φυσιολογικούς ιστούς, απομακρύνονται περιττά ή ελαττωματικά κύτταρα, προς όφελος των υπολοίπων. (Βιολογία του Καρκίνου, Κιτράκη και Τρούγκος, 2006)

Όταν τα κύτταρα πάψουν να είναι απαραίτητα επειδή, για παράδειγμα η δομή που αποτελούν δεν είναι πλέον απαραίτητη ή δεν μπορούν να προχωρήσουν σε

αντιγραφή εξαιτίας μόλυνσης από ιό, αυτοκτονούν με μια διαδικασία γνωστή ως **απόπτωση**. Απόπτωση ή Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος καλείται η διαδικασία κυτταρικού θανάτου με βάση συγκεκριμένες γονιδιακές εντολές που εκτελούνται σε ένα κύτταρο. Οι εντολές για το ‘πρόγραμμα απόπτωσης’ που εκτελείται, βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα, αλλά ενεργοποιούνται σε ορισμένα μόνο κύτταρα από συγκεκριμένα σήματα, ενδοκυτταρικής ή εξωκυτταρικής προέλευσης, που η φύση τους ποικίλει. Αυτά τα σήματα ακολουθούν διαφορετικές πορείες στα αρχικά τουλάχιστον στάδια, αλλά που σε μεταγενέστερα στάδια συγκλίνουν (Βιολογία του Καρκίνου, Κιτράκη και Τρούγκος, 2006). Ο κυτταρικός θάνατος γενικά κατηγοριοποιείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την απόπτωση που αντιπροσωπεύει τον ενεργό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τη νέκρωση που αντιπροσωπεύει το παθητικό κυτταρικό θάνατο χωρίς να είναι γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί που τη διέπουν (Gammal-Eldeen and Hegazy, 2010; Kong, 2009). Είναι δύο διακριτές λειτουργίες του κυτταρικού θανάτου που διαφέρουν στη μορφολογία, στο μηχανισμό και στη συχνότητα (Dive et all, 1992).

Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης έχουμε κυτταρική διόγκωση, διάρρηξη, ταχεία αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης (Kalka et all, 2000), μεταβολική κατάρευση και εξάντληση του ATP (Dive et all, 1992). Ενώ κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή (Kalka et all, 2000; Kim et all, 2012). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική και αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή. Η απόπτωση χωρίζεται σε τέσσερα στάδια, το στάδιο της απόφασης, που είναι αντιστρεπτό, την εκτέλεση, την αποδόμηση και τη φαγοκυττάρωση.

Πριν η πραγματική διαδικασία απόπτωσης λάβει χώρα, αποπτωτικά σήματα πρέπει να ωθήσουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες να αρχίσουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτό το στάδιο επιτρέπει τα αποπτωτικά σήματα να προκαλέσουν το κυτταρικό θάνατο ή η διαδικασία να σταματήσει αν το κύτταρο δε χρειάζεται να πεθάνει (Khan, 2010). Πολλές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην απόπτωση, αλλά έχουν αναγνωριστεί δύο κύριες μέθοδοι ρύθμισης, η στόχευση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων (μονοπάτι εκ των έσω) και η άμεση με τη μεταβίβαση του σήματος μέσω πρωτεϊνών προσαρμογέων (Mehta et all, 2010).

1.5.1 Στόχευση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων - Μιτοχονδριακή ρύθμιση

Τα μιτοχόνδρια είναι το μέρος όπου πραγματοποιείται η αερόβιος αναπνοή. Χωρίς μιτοχόνδρια, ένα κύτταρο πεθαίνει γρήγορα, ένα γεγονός που αξιοποιείται από κάποιες αποπτωτικές οδούς. Οι πρωτεΐνες της απόπτωσης που δρουν στα μιτοχόνδρια τα επηρεάζουν με ποικίλους τρόπους. Μπορεί να προκαλέσουν την διόγκωση του μιτοχονδρίου με το σχηματισμό μεμβρανικών πόρων ή μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης με αποτέλεσμα να προκληθεί απελευθέρωση ρυθμιστών της απόπτωσης. Αυτά αποτελούν μέρος του εσωτερικού μονοπατιού ρύθμισης της απόπτωσης.

Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες γνωστές ως SMACs (small mitochondria-derived activator of caspases) απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα ως αποτέλεσμα της αύξησης στη διαπερατότητα. Οι SMAC προσδένουν σε πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης (IAP, inhibitor of apoptosis proteins) και τις απενεργοποιούν, με αποτέλεσμα οι IAP να αδυνατούν να σταματήσουν τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι IAP επίσης καταστέλλουν μια οικογένεια άλλων πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες, που πραγματοποιούν την αποδόμηση του κυττάρου, άρα η διαπερατότητα των μιτοχονδρίων μπορεί να ρυθμίσει έμμεσα τη δράση των κασπασών.

Επίσης απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια το κυτόχρωμα c, εξαιτίας του σχηματισμού ενός διαύλου, γνωστού ως MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και έχει ρυθμιστική δράση καθώς προάγει δράσεις σχετικές με την απόπτωση (West and Marnett, 2006). Μόλις το κυτόχρωμα c απελευθερωθεί, προσδένεται στην πρωτεΐνη ενεργοποίησης της απόπτωσης 1 (APAF-1) και σε ATP, και στη συνέχεια προσδένεται στην προκασπάση-9 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου γνωστού ως αποπτόσωμα (Khan, 2010). Στο αποπτόσωμα η προκασπάση μεταπίπτει στην ενεργή μορφή της, την κασπάση-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη καθοριστή κασπάση-3.

Οι πόροι MAC ρυθμίζονται από διάφορες πρωτεΐνες, όπως αυτές που κωδικοποιούνται από την οικογένεια των αντιαποπτωτικών γονιδίων Bcl-2. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 είναι ικανές να προάγουν ή να καταστείλουν την απόπτωση δρώντας άμεσα πάνω στο MAC. Οι πρωτεΐνες Bax ή/και Bak σχηματίζουν το διάυλο, ενώ οι

πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xL ή Mcl-1 εμποδίζουν το σχηματισμό του. Επομένως η απόπτωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία μεταξύ των προαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bax και των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bcl-2 (Zhang, 2006).

Στα κύτταρα υπάρχουν όπως αναφέραμε, μηχανισμοί που ελέγχουν τόσο το εσωτερικό, όσο και το εξωτερικό κυτταρικό περιβάλλον, για την καλή λειτουργία του. Στο εσωτερικό υπάρχουν μόρια-αισθητήρες, που ανιχνεύουν τη δυσλειτουργία σε καθένα από τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Δεν είναι όμως όλα πλήρως γνωστά ούτε ο ακριβής τρόπος δράσης τους. Φαίνεται όμως πως υπάρχουν διαφορετικοί αισθητήρες ανάλογα με το κάθε πρόβλημα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι αισθητήρες αναφέρουν τη δυσλειτουργία σε ένα κεντρικό συντονιστή της πορείας του κυτταρικού κύκλου.

1.5.2 Άμεση σηματοδοτική οδός

Δύο θεωρίες σχετικά με την άμεση εκκίνηση των αποπτωτικών μηχανισμών στα θηλαστικά έχουν προταθεί: το μοντέλο που θεωρεί ότι η απόπτωση προκαλείται από τον παράγοντα TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων) και το μοντέλο σύνδεσης Fas-συνδέτη Fas. Και τα δύο μοντέλα περιλαμβάνουν τους υποδοχείς TNF (TNFR) να συνδέονται με εξωγενή σήματα.

Ο TNF είναι μια κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και είναι το κύριο εξωκυττάριο ενδιάμεσο της απόπτωσης. Τα περισσότερα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα έχουν δύο υποδοχείς TNF: TNF-R1 και TNF-R2. Η πρόσδεση του TNF στον TNF-R1 έχει αποδειχθεί ότι εκκινεί ένα μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών μέσω πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον υποδοχέα TNF στην περιοχή TNF receptor-associated death domain ή TRADD καθώς και με τον υποδοχέα FAS στην περιοχή Fas-associated death domain protein ή FADD. Η πρόσδεση στον υποδοχέα TNF μπορεί επίσης να οδηγήσει έμμεσα στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και την αντίδραση σε φλεγμονές. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο TNF δρα ως διαμεσολαβητής της αποπτωτικής διαδικασίας και έχει εκλεκτική κυτταροτοξικότητα απέναντι σε κακοήγη κύτταρα του καρκίνου του μαστού, προωθώντας την απόπτωση σε MCF-7 κύτταρα (Zhang et al, 2006).

1.5.3 Εκτέλεση

Πολλά μονοπάτια και σήματα οδηγούν στην απόπτωση, αλλά υπάρχει ένας συγκεκριμένος μηχανισμός που προκαλεί το κυτταρικό θάνατο. Αφότου το κύτταρο λάβει το ερέθισμα, υπόκειται σε οργανωμένη αποδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων από ενεργές πρωτεολυτικές κασπάσες. Το κύτταρο που υπόκειται σε απόπτωση έχει χαρακτηριστική μορφολογία:

1. Το κύτταρο συρρικνώνεται και γίνεται σφαιρικό επειδή ο πρωτεϊνικός κυτταροσκελετός του αποδομείται από τις κασπάσες.
2. Το κυτταρόπλασμα φαίνεται πυκνό και τα οργανίδια συμπυκνωμένα.
3. Η χρωματίνη συμπυκνώνεται σε συμπαγή κομμάτια στο πυρηνικό υμένα σε μια διαδικασία γνωστή ως πύκνωση, το σημείο καμπής της απόπτωσης.
4. Ο πυρηνικός φάκελος γίνεται ασυνεχής και το DNA μέσα του κομματιάζεται σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως καρυόρρηξη. Ο πυρήνας σπάει σε πολλά διακριτά χρωματινικά σώματα εξαιτίας της αποδόμησης του DNA.
5. Η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει ανώμαλα εξογκώματα.
6. Το κύτταρο διασπάται σε πολλά κυστίδια που ονομάζονται αποπτωτικά σώματα, τα οποία στη συνέχεια φαγοκυττάρωνονται.

Η απόπτωση διαδραματίζεται με μεγάλη ταχύτητα και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται γρήγορα, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να ανιχνευτεί. Κατά τη διάρκεια της καρυόρρηξης, οι ενεργές ενδονουκλεάσες κόβουν το DNA σε μικρά κομμάτια με συγκεκριμένο μήκος. Αυτό δίνει μία χαρακτηριστική κλιμακωτή εμφάνιση στη γέλη από άγαρ ύστερα από ηλεκτροφόρηση. Έλεγχος για κλιμάκωση DNA (DNA laddering) διαφοροποιεί την απόπτωση από ισχαιμικό ή τοξικό κυτταρικό θάνατο.

1.5.4 Απομάκρυνση νεκρών κυττάρων

Η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων γίνεται από γειτονικά φαγοκύτταρα για την αποφυγή φλεγμονής ή κάποιας αντίδρασης στο εσωτερικό των κυττάρων (Dive et all, 1992). Τα ετοιμοθάνατα κύτταρα που βρίσκονται στα τελευταία στάδια της απόπτωσης παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους μόρια που αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα. Αυτά τα μόρια σηματοδοτούν τα κύτταρα για φαγοκυττάρωση από κύτταρα που κατέχουν κατάλληλους υποδοχείς, όπως τα μακροφάγα. Η απομάκρυνση

των νεκρών κυττάρων από τα φαγοκύτταρα συμβαίνει χωρίς να προκληθεί φλεγμονώδης αντίδραση.

Το τελικό αποτέλεσμα της απόπτωσης είναι η αποφυγή της μεταφοράς της κυτταρικής βλάβης σε επόμενες γενιές, καθώς το κύτταρο συστέλλεται και ακολουθεί φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα, έτσι δεν επηρεάζει τα γειτονικά υγιή κύτταρα και προτιμάται έναντι της νέκρωσης, όπου το κύτταρο οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο σε περίπτωση μη αναστρέψιμης βλάβης, που όμως ακολουθείται από φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού.

Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί σημαντική παράμετρο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Γνωρίζοντας το μηχανισμό δράσης της, έχουμε ένα εργαλείο για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Διάφορες καρκινογόνες ουσίες με μιτογόνο δράση αναστέλλουν την απόπτωση (Bursch et al, 1992). Έχει αποδειχτεί ότι αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επάγουν την απόπτωση, όπως η ταμοξιφένη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Bursch et al, 1992) ή η σουλινδάκη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που αναστέλλει την ανάπτυξη πολυπόδων στο παχύ έντερο (Labayle et al, 1991). Έχει αποδειχτεί ότι η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wainfan and Poirier, 1992). Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν σαν δότες μεθυλικών ομάδων. Για παράδειγμα, η μεθειονίνη που συμμετέχει μαζί με το φολικό οξύ και τη βιταμίνη B12 στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου μεταβολισμού του μεθυλίου, αναστέλλει τους χημικά προκαλούμενους όγκους του μαστού σε αρουραίους (Wainfan and Dizik 1987). Επίσης, η απόπτωση στα MCF-7 κύτταρα επάγεται από βιοενεργά συστατικά των εκχυλισμάτων λεμονιού που είναι πηγή αντιοξειδωτικών, μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης αυξάνοντας την Bax, μειώνοντας την Bcl-2 και απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα c στο κυτοσόλιο (Kim et al, 2012). Το ίδιο ισχύει και για τη στεβιοσίδη, ένα συστατικό του φυτού στέβια με την οποία έγιναν πειράματα σε MCF-7 κύτταρα (Paul, 2012).

Χημειοπροστατευτικός παράγοντας	Μηχανισμός απόπτωσης
Ρετινοϊκά οξέα	Ενεργοποίηση κασπασών, ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas
Ασπιρίνη	Επαγωγή της Bax, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση κασπασών
Σουλινδάκη	Ενεργοποίηση των υποδοχέων νέκρωσης, των κασπασών και της Bax
Ρεσβερατρόλη	Ενεργοποίηση κασπασών, επαγωγή του υποδοχέα Fas
Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη	Παραγωγή H ₂ O ₂ (οι ROS προκαλούν απόπτωση), ενεργοποίηση των υποδοχέων Fas, ενεργοποίηση κασπασών, ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p21
Ταμοξιφαίνη	Ενεργοποίηση των κασπασών, προ-οξειδωτική δράση, αναστολή των αντι-αποπτικών πρωτεϊνών (Bcl-2)
Γενιστεΐνη	Ενεργοποίηση των κασπασών, επαγωγή της Bax, επαγωγή της p21
Κουρκουμίνη	Ενεργοποίηση των κασπασών, προ-οξειδωτική δράση, επαγωγή της Bax

Πίνακας 2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες και ο αντίστοιχος μηχανισμός δράσης τους για την πρόκληση απόπτωσης

1.6 Σκοπός

Η παρούσα επιστημονική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα. Ο σκοπός της ήταν να ανιχνεύσουμε πιθανή αντικαρκινική δράση από δείγματα προϊόντων και παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό *Punica Granatum* (Ροδιά) σε κύτταρα του καρκίνου του μαστού (MCF-7 καρκινική σειρά), καθώς είναι μία από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου στη σύγχρονη κοινωνία. Στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων μας με τη μέθοδο του XTT. Στο δεύτερο μέρος, επιλέχθηκε το πιο δραστικό δείγμα και μελετήθηκε η πιθανή πρόκληση απόπτωσης στα κύτταρα έπειτα από την επίδραση του εκχυλίσματος κατά 1/5, 1, 2, 4 και 6 ώρες με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Με την ίδια μέθοδο προσδιορίστηκαν επίσης οι ελεύθερες ρίζες και η γλουταθειόνη των κυττάρων έπειτα από την επίδραση του εκχυλίσματος κατά τις ίδιες χρονικές στιγμές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

‘Υλικά και Μέθοδοι’

2.1 Υλικά

Για το πείραμά μας χρησιμοποιήσαμε τα εξής υλικά:

- Καρκινικά κύτταρα του μαστού της σειράς MCF-7
- Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM: 4.5gr/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Διάλυμα Πενικιλίνης(100 units/ml) / Στρεπτομυκίνης(100μg/ml) (antibiotic- antimitotic solution) (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)
- PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- Τριψίνη 0.25% (Gibco)
- Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)
- DMSO , Dimethyl Sulfoxide - διμεθυλοσουλφοξείδιο) $[(CH_3)_2SO]$ (Merck-Γερμανία) (Sigma)
- Πολυφαινολικά εκχυλίσματα προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων βιομηχανικής παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού Ροδιά (Punica Granatum)

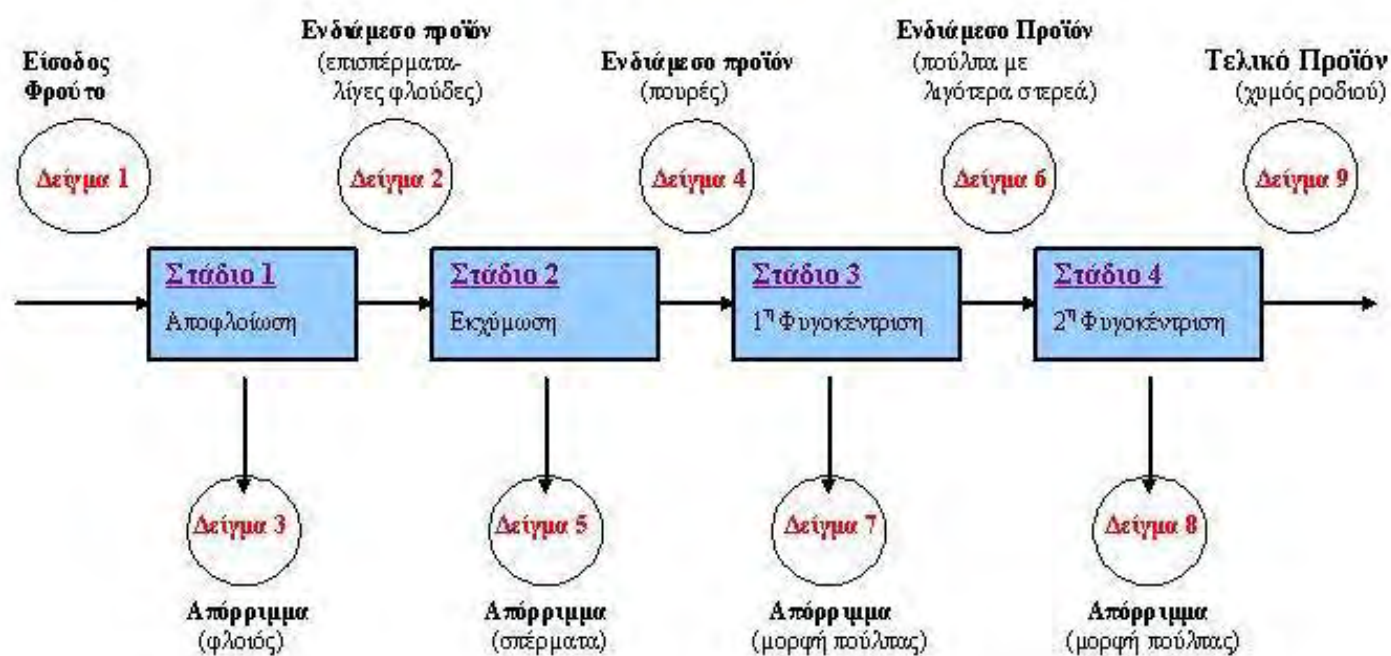
Επίσης, για την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκαν:

- FACS Clean (Becton-Dickinson)
- FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- Απεσταγμένο νερό
- Χρωστική Απόπτωσης PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, (Becton-Dickinson)
- Χρωστική Orange mercury (Sigma) – Προσδιορισμός Γλουταθειόνης (εκπέμπει στο FL-2)
- Χρωστική DCF (Sigma) – Προσδιορισμός ελεύθερων ριζών (εκπέμπει στο FL-2)

2.2 Εκχυλίσματα

Η παραλαβή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμά μας έγινε από τη βιομηχανική γραμμή παραγωγής χυμού ροδιού της εταιρίας «*VITOM – Αφοί Χριστοδούλου*» το Νοέμβριο του 2011 από μέλη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η δειγματοληψία έγινε από εννέα διαφορετικά σημεία παραγωγής που φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

Διάγραμμα Ροής



Εικόνα 23. Σημεία δειγματοληψίας στη βιομηχανική γραμμή παραγωγής χυμού ροδιού της εταιρίας Vitom

Πιο συγκεκριμένα κάθε ένα από τα εννέα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Αρ. Δείγματος	Θέση Δειγματοληψίας	Περιγραφή
1	Πρώτη ύλη (Είσοδος φρούτου)	Φρούτο (Ρόδι) Μόνο το εδώδιμο μέρος (χωρίς τον φλοιό και τα άσπρα τοιχώματα)
2	Προϊόν 1 ^{ου} Σταδίου (Ενδιάμεσο προϊόν) (Αποφλοιώση)	Επισπέρματα (Arils) και μικρές ποσότητες φλοιών και άσπρων τοιχωμάτων
3	Απόρριμμα 1 ^{ου} Σταδίου	Φλοιοί (peels)
4	Προϊόν 2 ^{ου} Σταδίου (Ενδιάμεσο προϊόν) (Εκχύμωση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πουρέ
5	Απόρριμμα 2 ^{ου} Σταδίου	Σπέρματα (seeds)
6	Προϊόν 3 ^{ου} Σταδίου (Ενδιάμεσο προϊόν) (1^η Φυγοκέντρωση)	Ενδιάμεσο προϊόν σε μορφή πούλπας με λιγότερα στερεά
7	Απόρριμμα 3 ^{ου} Σταδίου	Μορφή Πούλπας
8	Απόρριμμα 4 ^{ου} Σταδίου (2^η Φυγοκέντρωση)	Μορφή Πούλπας
9	Τελικό Προϊόν (Εξοδος)	Χυμός Ροδιού

Πίνακας 3. Λίστα δειγμάτων

Η μετέπειτα επεξεργασία των δειγμάτων και η απομόνωσή των εκχυλισμάτων από αυτά έγινε επίσης στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Συγκεκριμένα, έγινε ξήρανση των δειγμάτων με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης εκτός του δείγματος αριθμού 5 η οποία έγινε με αέρα. Μετά ακολούθησε κονιορτοποίηση και ζύγιση. Ένα μέρος τους (περίπου 30gr) τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και εκχυλίστηκε για 40 λεπτά σε λουτρό υπερήχων σε ελεγχόμενη θερμοκρασία, <25°C. Έπειτα τα δείγματα διηθήθηκαν σε χωνί Büchner με χάρτινο φίλτρο και συμπυκνώθηκαν υπό κενό σε θερμοκρασία <35°C. Το υπόλειμμα αυτό που απομονώθηκε ήταν παχύρευστο,

επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και φυγοκετρήθηκε. Στη συνέχεια εκχυλίστηκε με καθαρό εξάνιο για να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες και συμπυκνώθηκε ξανά υπό κενό δίνοντας τα τελικά στερεά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν. Τα στερεά αυτά εκχυλίσματα (κυρίως σε μορφή σκόνης) ζυγίστηκαν για να προσδιοριστεί η συνολική τους απόδοση η οποία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

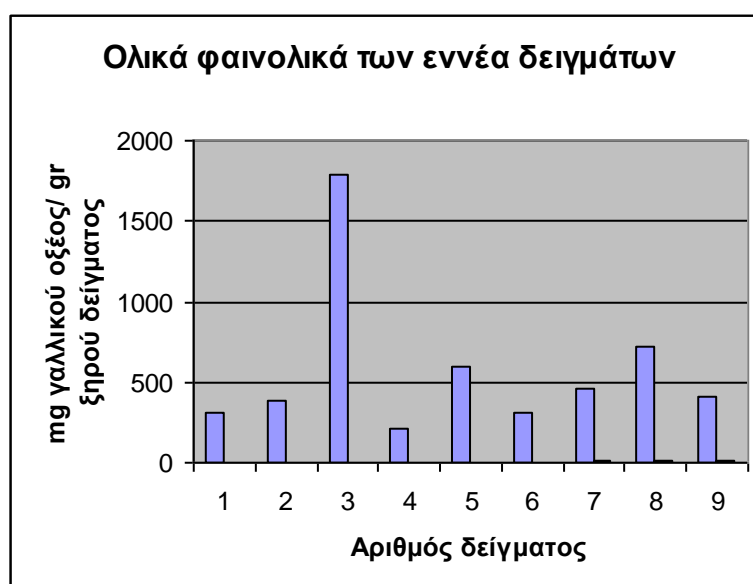
Δείγματα	Βάρος Δείγματος (g)		Απόδοση %
	Πριν την Εκχύλιση	Μετά την εκχύλιση	
1	23,37	0,2307	0,99
2	15,27	0,1719	1,13
3	30,74	0,2633	0,86
4	8,64	0,1397	1,62
5	30,85	0,1008	0,33
6	30,30	0,3308	1,09
7	30,46	0,6490	2,13
8	31,25	0,6490	2,08
9	20,78	0,2997	1,44

Πίνακας 4. Απόδοση εκχύλισης

Έπειτα από την απομόνωση των εκχυλισμάτων ακολούθησαν και άλλες τεχνικές επεξεργασίας για να προσδιοριστούν τα διάφορα συστατικά των εκχυλισμάτων αυτών. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά των δειγμάτων αυτών με τη βοήθεια της μεθόδου Folin- Ciocalteu. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων η οποία εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά gr ξηρού δείγματος.

Δείγματα	Ολικά Φαινολικά (mg γαλλικού οξέος / g ξηρού δείγματος)
1	309
2	382
3	1786
4	216
5	595
6	308
7	456
8	719
9	405

Πίνακας 5. Ολικά φαινολικά των δειγμάτων

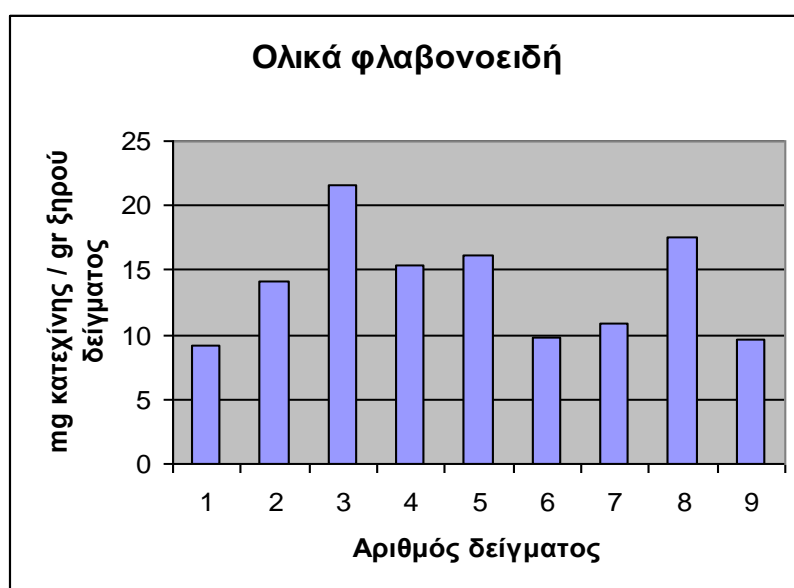


Γράφημα 3. Γραφική απεικόνιση ολικών φαινολικών των δειγμάτων

Στα δείγματα προσδιορίστηκαν επίσης τα ολικά φλαβονοειδή με τη μέθοδο, συγκεκριμένα μια παραλλαγή της, των Gunes και των συνεργατών του. Η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της κατεχίνης ως πρότυπη ουσία και εκφράστηκε σε mg κατεχίνης ανά gr ξηρού δείγματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγματα	Ολικά Φλαβονοειδή (mg κατεχίνης / gr ξηρού δείγματος)
1	9,1
2	14,1
3	21,6
4	15,4
5	16,1
6	9,8
7	10,9
8	17,6
9	9,7

Πίνακας 6. Ολικά φλαβονοειδή των δειγμάτων



Γράφημα 4. Γραφική απεικόνιση ολικών φλαβονοειδών των δειγμάτων

Επίσης στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών έγινε και ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός πολυφαινόλων των δειγμάτων αυτών με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid chromatography). Για την εφαρμογή της μεθόδου τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και διηθήθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα εκφρασμένα ως mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος.

Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινολών (mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)								
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9
Π-κουμαρικό οξύ - Ελλαγικό οξύ	98,37	298,98	167,74	253,08	238,52	434,90	189,82	269,04	494,12
Χλωρογενικό οξύ	48,99	49,25	48,76	47,69	48,43	48,11	47,73	47,86	47,67
Κατεχίνη	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Κερκετίνη	33,61	37,25	35,76	34,42	40,53	36,91	34,24	35,58	34,67
Επικατεχίνη	65,41	38,21	36,38	47,99	58,42	66,65	58,24	40,74	42,96
<i>Trans</i> - ρεσβερατρόλη	44,94	44,99	44,76	44,77	44,79	45,47	44,94	45,15	45,77
Φλοριζίν (phloridzin)	36,94	40,78	33,59	32,98	33,84	34,19	33,30	32,58	33,32
Προτοκατεχικό οξύ	75,84	62,18	52,40	66,05	47,28	48,65	40,42	64,29	44,04
Γαλλικό οξύ	181,76	149,47	150,02	143,76	135,47	148,80	134,52	136,96	138,79
Καφεϊκό οξύ	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Φερουλικό οξύ	45,96	46,93	45,89	45,84	48,63	46,15	45,91	45,61	46,20
Ρουτίνη	93,78	101,76	117,54	91,33	124,29	97,016	93,12	88,92	95,05

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις μονομερών πολυφαινολών των εκχυλισμάτων

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Καλλιέργεια της καρκινικής σειράς MCF-7

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά MCF-7 η οποία και καλλιεργήθηκε σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό ένα διάλυμα από :

- DMEM-41966 εμπλουτισμένο με 10% FBS,
- 1% L-γλουταμίνη και
- 1% διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης.

Τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο με σταθερές συνθήκες (37°C και 5% CO₂). Τα κύτταρα παρέμεναν στις φλάσκες με 5ml θρεπτικό υλικό έως ότου καλύψουν το 70-80% της επιφάνειάς της φλάσκας. Έπειτα γίνονταν ανακαλλιέργεια (split) αποκολλώντας τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας με την προσθήκη 330ml τρυψίνης 0.25%. Ακολουθούσε επώαση για 5λεπτά στον κλίβανο και έπειτα αφού τα κύτταρα είχαν αποκολληθεί επαναιωρούνταν σε νέα φλάσκα με νέο θρεπτικό υλικό όπως το αρχικό (με 10% FBS). Όλοι οι χειρισμοί και η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε όσο το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες και μέσα σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.3.2 Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

2.3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αντικαρκινικής ιδιότητας των εκχυλισμάτων προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων παραγωγής χυμού ροδιού σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7) έγιναν με τη βοήθεια του kit XTT assay της εταιρείας Roche. Αυτή είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που ανιχνεύει τις μεταβολικές δραστηριότητες των ζωντανών κυττάρων. Συγκεκριμένα η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα που έχει το κίτρινο τετραμμεωνιακό άλας (XTT-B) να μεταβολίζεται από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες (ένζυμα) των κυττάρων στο μεταβολίτη φορμαζάνη που έχει έντονο πορτοκαλί χρώμα. Τα μιτοχονδριακά αυτά ένζυμα αδρανοποιούνται αμέσως μετά το θάνατο των κυττάρων, έτσι αυτή η μετατροπή συμβαίνει μόνο σε ζωντανά κύτταρα και συνεπώς η ποσότητα της φορμαζάνης που παράγεται είναι ανάλογη των ζώντων κυττάρων στο δείγμα.

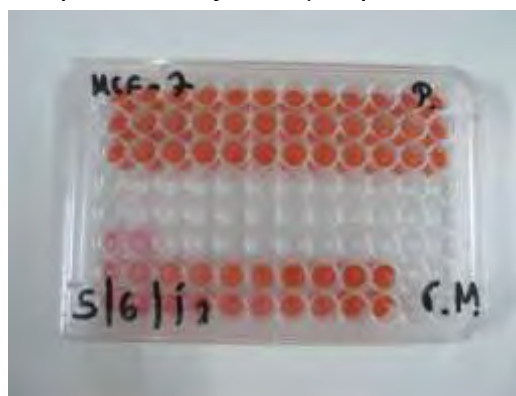
Η φορμαζάνη που σχηματίζεται είναι διαλυτή σε υδατικό διάλυμα και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μετρώντας την απορρόφηση στα 450nm μήκος κύματος σε ένα φασματοφωτόμετρο(Elisa reader). Όσο λιγότερα ζωντανά κύτταρα έχουμε στο δείγμα τόσο μικρότερη απορρόφηση έχουμε λόγω του μειωμένου μεταβολισμού του τετραμωνιακού άλατος. Μπορούμε έτσι να ελέγξουμε τη δράση των εκχυλισμάτων που εφαρμόσαμε.

Η μέθοδος βιωσιμότητας των κυττάρων με το XTT kit assay είναι μια πολύ καλή λύση ποσοτικοποίησης του πολλαπλασιασμού και ζωτικότητας των κυττάρων χωρίς τη χρήση ραδιενεργών ισοτόπων. Γενικά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Η ευκολία στη χρήση, δεν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια ή πλύσιμο των κυττάρων
- Είναι διαδικασία ενός βήματος, έχουμε αποτελέσματα μέσα σε 2-5ώρες
- Η μεγάλη ευαισθησία, μπορούμε να πάρουμε αποτελέσματα και με μικρή ποσότητα κυττάρων
- Η ακρίβεια, γιατί η απορρόφηση είναι ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων
- Η ασφάλεια, γιατί δεν χρειάζονται ραδιενεργά ισότοπα
- Η διευκόλυνση καθώς το μόνο που απαιτείται είναι μόνο ένα φασματοφωτόμετρο

2.3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Μετά την επαναιώρηση των κυττάρων από την φλάσκα κάναμε μέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer και τοποθετούσαμε 20.000 κύτταρα σε κάθε θέση ενός Eliza plate 96 θέσεων. Τα κύτταρα τα επωάζονταν με θρεπτικό υλικό όπως το αρχικό (με 10% FBS) για περίπου μία ημέρα μέχρι να προσκολληθούν, σε σταθερές συνθήκες (37°C και 5% CO₂) μέσα στον κλίβανο. Μετά την επώαση αυτή αφαιρούνταν αυτό το θρεπτικό υλικό και προσθέταμε εκχυλίσματα ροδιού (φυτικές πολυφαινόλες) σε διάφορες συγκεντρώσεις διαλυμένα όμως αυτή τη φορά σε θρεπτικό υλικό χωρίς 10% FBS.



Εικόνα 24. Elisa plate με κύτταρα και εκχύλισμα

Αποφεύγαμε έτσι την αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις δραστικές ουσίες των εκχυλισμάτων. Τα κύτταρα τώρα επωάζονταν για 24 ώρες ξανά μέσα στον κλίβανο (37°C και 5% CO₂) και έπειτα τοποθετούνταν μίγμα XTT/reagent (50μl/θέση) και επωάζονταν ξανά για 4ώρες. Το μείγμα του XTT/reagent είχε την αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B το οποίο προετοιμάστηκε μέσα στο θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής. Σε κάθε επανάληψη του πειράματος για να έχουμε πιο αντικειμενικά αποτελέσματα χρησιμοποιήσαμε και αρνητικούς μάρτυρες που περιείχαν μόνο κύτταρα ή μόνο τα εκχυλίσματα. Λόγω του ότι μερικά εκχυλίσματα δεν διαλύονταν απευθείας στο θρεπτικό μέσο που αναφέραμε χρησιμοποιήθηκε σε αυτά θρεπτικό μέσο με 1%DMSO για το οποίο είχε γίνει πρώτα έλεγχος για τη μη επίδρασή του στα κύτταρα έτσι ώστε να μην επηρεάσει το πείραμά μας. Έπειτα από τις 4ώρες επώασης τα δείγματά μας μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Elisa plate reader (Biotek) με τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η απορρόφησή τους μετρήθηκε στα 450nm και ο υπολογισμός της % αναστολής στην κυτταρική αύξηση έγινε με τον τύπο:

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

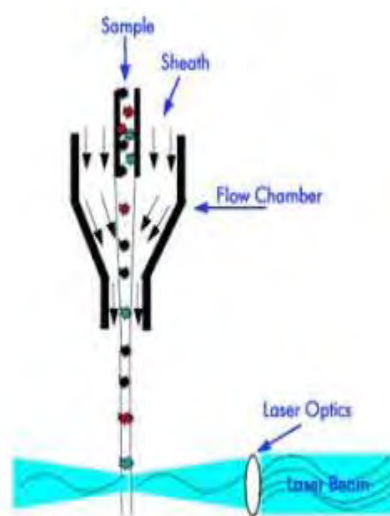
Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο με τρεις φορές για κάθε συγκέντρωση και σε κάθε επανάληψη η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν επίσης δύο με τρεις φορές.

2.3.3 Κυτταρομετρία Ροής

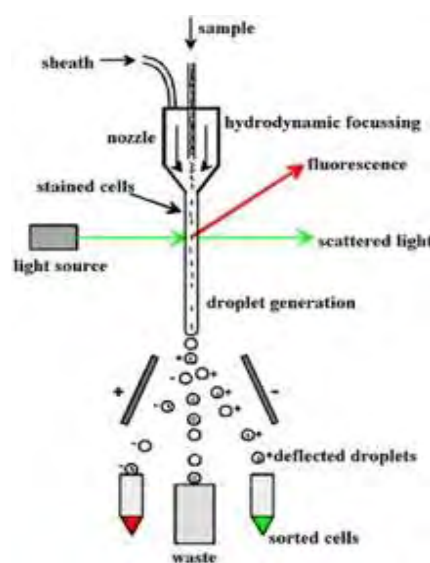
Μια δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή είναι η κυτταρομετρία ροής. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη χρήση laser για την καταμέτρηση και τον διαχωρισμό των κυττάρων. Επιτρέπει την ταυτόχρονη πολύ-παραμετρική ανάλυση των φυσικών ή και χημικών χαρακτηριστικών χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Όσον αφορά την αρχή της μεθόδου, μια δέσμη φωτός (συνήθως η δέσμη είναι laser) ενός μόνο μήκους κύματος οδηγείται πάνω στο υδροδυναμικό ρεύμα υγρού. Ένα πλήθος από ανιχνευτές στοχεύονται στο σημείο από το οποίο το ρεύμα διέρχεται μέσα από την δέσμη των ακτίνων. Ο πρώτος ανιχνευτής αφορά τον καθορισμό του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC). Ο δεύτερος αφορά την κοκκίωση του κυττάρου, δηλαδή με άλλα λόγια την

πολυπλοκότητά του (Side Scatter or SSC). Όσο πιο κοκκιωμένο είναι ένα κύτταρο, τόσο υψηλότερο θα εμφανίζεται το επίπεδο του SSC. Επιπλέον, εκτός από τις δυο αυτές βασικές παραμέτρους, το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής είναι σε θέση να ανιχνεύσει και φθορίζοντες ανιχνευτές. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι και οι χρωστικές οι οποίες χρησιμοποιήσαμε DCF, Mercury Orange και της απόπτωσης (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I).

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λ.π.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα **πλεονεκτήματα** της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται (Ehemann et al., 2003). Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό



Εικόνα 25. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της κυτταρομετρίας.



Εικόνα 26. Υδροδυναμική στίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διαταταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απ'ευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση

κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφορών κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

2.3.3.1 Συσκευές κυτταρομετρίας ροής

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων το δευτερόλεπτο, σε "πραγματικό χρόνο", και ορισμένες έχουν επιπλέον τη δυνατότητα ενεργού διαχωρισμού και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες.



Εικόνα 27. Κυτταρόμετρο στο οποίο μετρήθηκαν τα δείγματα

Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί να παράγει την εικόνα ενός κυττάρου, η κυτταρομετρία ροής παρέχει δεδομένα για τα χαρακτηριστικά ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων σε λίγο χρόνο. Για την ανάλυση στερεών ιστών θα πρέπει πρώτα να παρασκευαστεί εναιώρημα απομονωμένων (όχι συσσωματικών) κυττάρων.

Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από 5 κύρια συστατικά μέρη:

- μία ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid) η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- ένα οπτικό σύστημα -συνήθως χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου)- υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού,

χρωστικό λέιζερ)· αερόψυκτα λέιζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488nm), ερυθρού-HeNe (633nm), πράσινο-HeNe, HeCd (υπεριώδες))· λέιζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες)- που παράγει φωτεινά σήματα

- έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion - ADC) - το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον H/Y
- ένα σύστημα ενίσχυσης - δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
- έναν H/Y για την ανάλυση των σημάτων.

Τα σύγχρονα όργανα κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά λέιζερ και ανιχνευτές φθορισμού (το τρέχον ρεκόρ για όργανο που κυκλοφορεί στην αγορά είναι 4 λέιζερ και 18 ανιχνευτές φθορισμού). Η αύξηση του αριθμού των λέιζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων και συνεπώς δίνει τη δυνατότητα για πιο ακριβή ταυτοποίηση των πληθυσμών που αποτελούν το στόχο βάσει του φαινοτύπου των τελευταίων. Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφίσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων.



Εικόνα 28. Tube μέσα στο οποίο αναλύονταν το δείγμα μας

Με αυτή τη μέθοδο μελετήθηκαν τρία χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων MCF-7. Μελετήθηκε η απόπτωσή τους, η ύπαρξη ελεύθερων ριζών (ROS) και η ύπαρξη γλουταθειόνης (GSH) έπειτα από τη δράση του εκχυλίσματος **Δείγμα 3** κατά $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 και 6 ώρες σε συγκέντρωση 50μg/ml η οποία είναι κοντά στο IC50 του συγκεκριμένου εκχυλίσματος.

2.3.4 Απόπτωση

Η απόπτωση μελετήθηκε με τη βοήθεια δύο χρωστικών Annexin και 7-AAD οι οποίες δρουν συνεργαστικά, επικαλύπτοντας η μια το αποτέλεσμα της άλλης. Αρχικά φροντίζαμε να έχουμε ισόποση ποσότητα κυττάρων σε 6 φλάσκες. Η μία ήταν η φλάσκα- Control και οι άλλες ήταν οι φλάσκες στις οποίες το εκχύλισμα το αφήναμε να δράσει αντίστοιχα ½, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Κάναμε επαναιώρηση των κυττάρων από τις φλάσκες και μετρούσαμε την ποσότητα που έχουμε στην πλάκα Neubauer. Έπειτα τα βάζαμε και falkon και κάναμε φυγοκέντριση για 10λεπτά, στους 22° C σε 372g. Ρίχναμε το υπερκείμενο, κάναμε πλύση με 2 ή 3ml PBS και ξανακάναμε φυγοκέντριση (10λεπτά, 22° C στα 372g). Ρίχναμε ξανά το υπερκείμενο και κάναμε πάλι πλύση με ισόποση ποσότητα PBS σπάζοντας τα κύτταρα με την πιπέτα και κάναμε και μια τρίτη φυγοκέντριση (10λεπτά, 22° C στα 372g). Τέλος, πετούσαμε το υπερκείμενο και βάζαμε τόση ποσότητα Binding Buffer σε κάθε falkon έτσι ώστε να έχουμε συγκέντρωση με 200.000/ falkon. Τα falkon εν τω μεταξύ τα διατηρούσαμε στον πάγο. Έπειτα φτιάχναμε τα tubes που θα μετρούσαμε στο κυτταρόμετρο. Προσθέταμε τα κύτταρα και τις χρωστικές (3μl Annexin και 5μl 7AAD). Έπειτα ακολουθούσε επώαση στον κλίβανο για 15λεπτά και τέλος προσθέταμε ξανά 400μl BB Buffer. Τότε τα tubes ήταν έτοιμα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο. Από κάθε διαφορετική κατάσταση που μελετούσαμε, μετρούσαμε τέσσερα διαφορετικά tubes. Το πρώτο είναι το 'unstained' που δεν έχει καμία χρωστική αλλά μόνο κύτταρα, το δεύτερο είναι με την πρώτη χρωστική 'Annexin', το τρίτο είναι με τη δεύτερη χρωστική '7AAD' και το τέταρτο είναι και με τις δύο χρωστικές μαζί 'A+7-AAD'. Αυτό που ουσιαστικά εμείς συγκρίναμε είναι το τέταρτο tube στις διάφορες χρονικές περιόδους και πως εξελίσσονταν το φαινόμενο της απόπτωσης με το πέρασμα του χρόνου.



Εικόνα 29. Χρωστικές απόπτωσης: Annexin V, 7-AAD και Binding Buffer

2.3.5 Προσδιορισμός Ελευθέρων ριζών (ROS) και Γλουταθειόνης (GSH)

Έπειτα προσδιορίστηκαν οι ελεύθερες ρίζες και η γλουταθειόνη στις διάφορες χρονικές στιγμές όπως και πριν, σε ½, 1, 2, 4 και 6 ώρες εφαρμογής του εκχυλίσματος με λίγο διαφορετική διαδικασία προετοιμασίας όμως. Είχαμε ξανά 6φλάσκες με κύτταρα. Αφού τα επαναιωρούσαμε σε falcon, κάναμε φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 5° C και στα 300g. Πετούσαμε το υπερκείμενο και βάζαμε 2 ή 3ml PBS και κάναμε πλύση των κυττάρων και μετά μια δεύτερη φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες (10λεπτά, 5° C, 300g). Πετούσαμε ξανά το υπερκείμενο και κάναμε πάλι πλύση με ίση ποσότητα PBS. Έπειτα χωρίζαμε την ποσότητα των κυττάρων που είχαμε στα tubes και κάναμε πάλι φυγοκέντριση (10λεπτά, 5° C, 300g). Πετούσαμε το υπερκείμενο και προσθέταμε 150μl PBS σε κάθε tube. Έπειτα προσθέταμε σε μια σειρά tube τη μία χρωστική και σε μια άλλη σειρά την άλλη χρωστική για να μετρηθούν και οι δύο παράμετροι ταυτόχρονα. Στα tube που θέλαμε να μετρήσουμε το control είχαμε επίσης tube ‘unstained’ και tube με μόνη μεθανόλη και μόνο ακετόνη γιατί η μεν χρωστική των ελευθέρων ριζών (DCF) διαλύεται σε μεθανόλη και η δε της γλουταθειόνης (Mercury Orange) διαλύεται σε ακετόνη. Τα tube έπειτα έμπαιναν στον κλίβανο για επώαση 30 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέταμε 250μl PBS σε κάθε tube και ξανακάναμε φυγοκέντριση (10λεπτά, 5° C, 300g). Έπειτα πετούσαμε το υπερκείμενο, προσθέταμε 250μl PBS σε κάθε tube και ήταν έτοιμα για ανάλυση στο κυτταρόμετρο.



Εικόνα 30. Χρωστικές DCF και Mercury Orange

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

‘Αποτελέσματα’

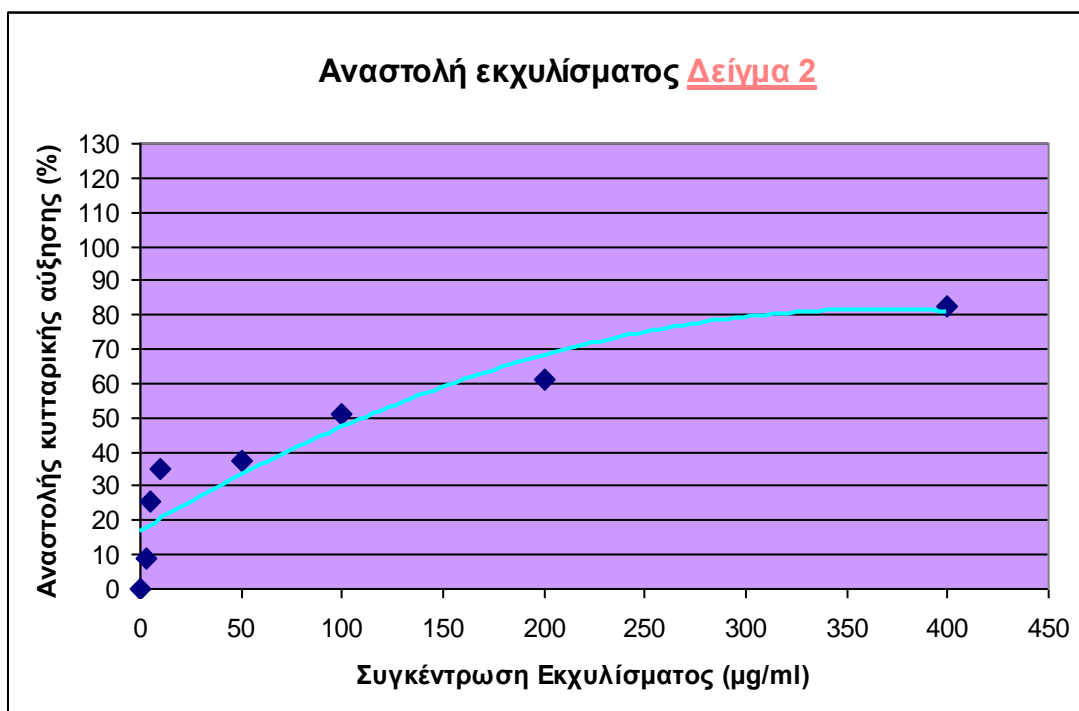
3.1 Προσδιορισμός αντικαρκινικής ικανότητας εκχυλισμάτων χυμού ροδιού με τη μέθοδο του XTT.

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση εννέα εκχυλισμάτων χυμού ροδιού τα οποία όπως είπαμε προήλθαν από τα στάδια παραγωγής μιας βιομηχανίας που παράγει φυσικό χυμό ροδιού. Η αντικαρκινική τους δράση μελετήθηκε σε καρκινικά κύτταρα της σειράς MCF-7 με τη μέθοδο του XTT έπειτα από επώαση 24ώρων με το εκχύλισμα. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα με τον αριθμό 1, 4 και 5 δεν μελετήθηκαν γιατί ήταν δυσδιάλυτα στο θρεπτικό μέσο αλλά και σε διάλυμα θρεπτικού μέσου με 1%DMSO. Τα εκχυλίσματα 2, 3, 7 και 9 διαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο και μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 50, 100, 200 και 400μg/ml τα πρώτα δύο και σε 5, 10, 50, 100, 200 και 400μg/ml τα δεύτερα. Ενώ τα εκχυλίσματα 6 και 8 μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις 5, 10, 50, 100, 200 και 400μg/ml αλλά διαλύθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 1% DMSO. Βρέθηκε έπειτα το IC₅₀ των εκχυλισμάτων αυτών και έγιναν συγκρίσεις. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι η αντικαρκινική ιδιότητα του εκχυλίσματος. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες με την % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από κάθε ένα από τα εκχυλίσματά μας.

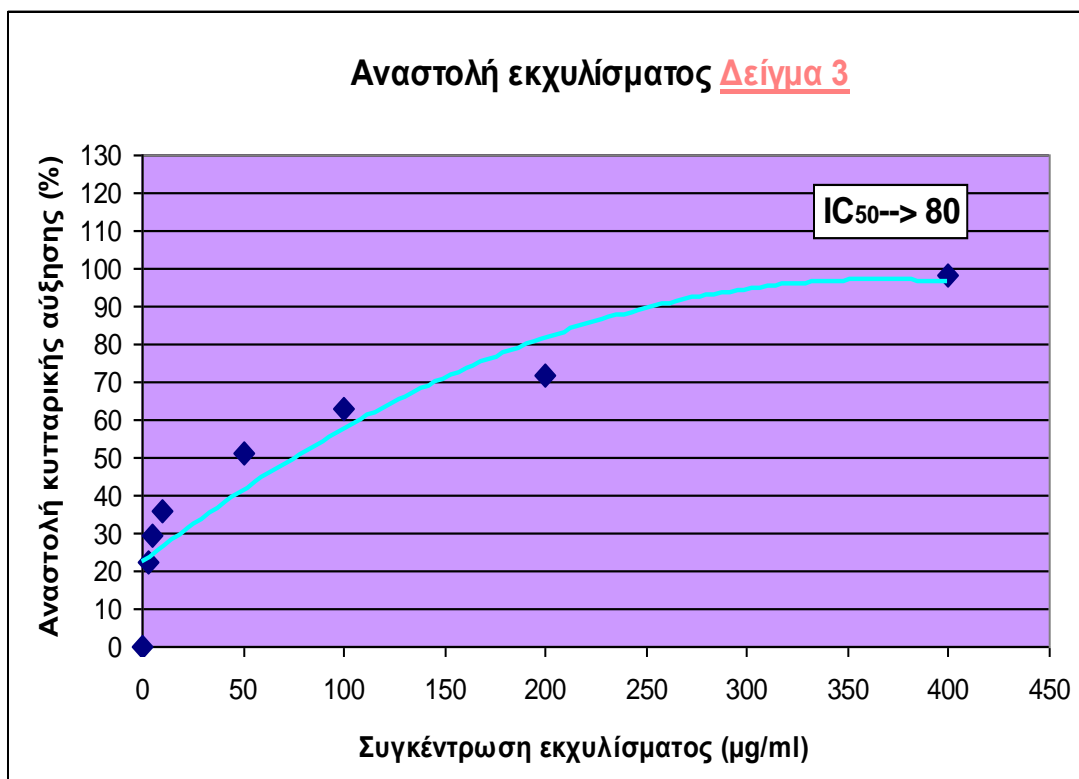
Όπως βλέπουμε στα γραφήματα 3 - 8, η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων μας είναι δόσοεξαρτώμενη. Δηλαδή με μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος έχουμε και μεγαλύτερη αναστολή η οποία φτάνει μέχρι και το 100% στο δείγμα 3, 7 και 8.

Στο γράφημα 9 φαίνονται συγκεντρωτικά οι τιμές του IC₅₀ των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 75μg/ml που ήταν το εκχύλισμα με την πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση (Δείγμα 8 – απόρριμμα, μορφή πούλπας), έως 125μg/ml που ήταν το λιγότερο ισχυρό (Δείγμα 7 - απόρριμμα, μορφή πούλπας). Από αυτό το γράφημα μπορούμε να κατατάξουμε τα δείγματά μας ανάλογα με την τιμή του IC₅₀ κατά σειρά δραστηριότητας ως εξής από το πιο ισχυρό προς το λιγότερο ισχυρό:

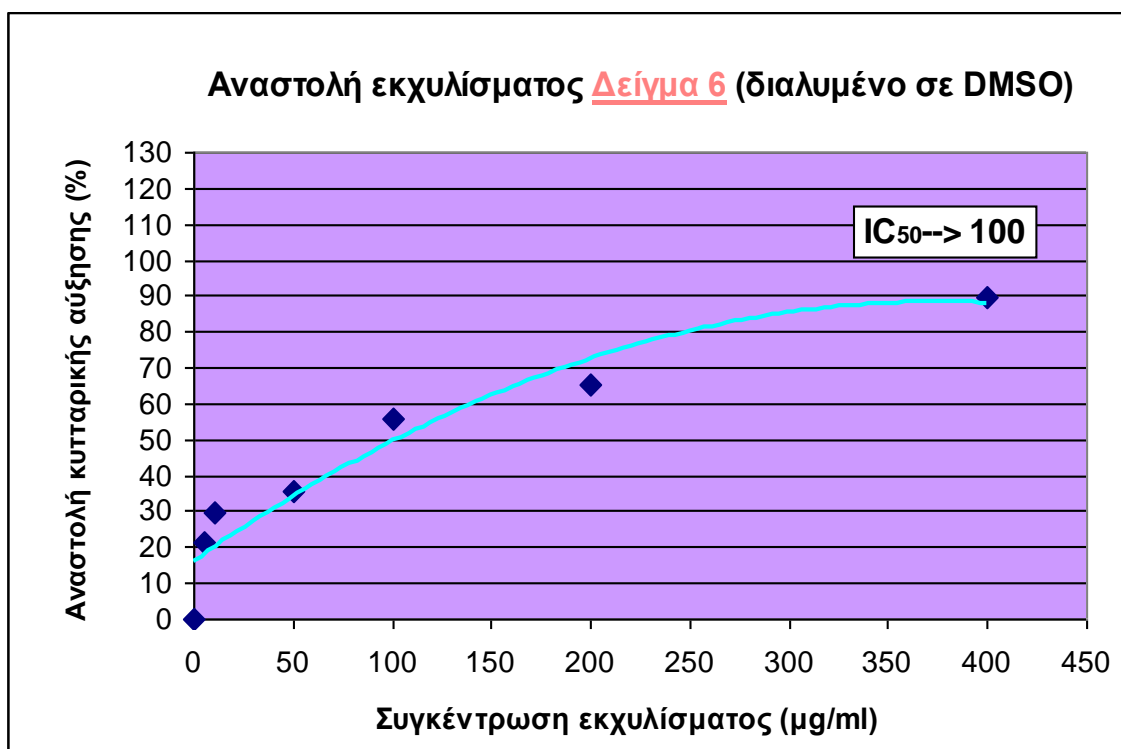
Δείγμα 8(απόρριμμα) > Δείγμα 3(απόρριμμα) > Δείγμα 6(ενδιάμεσο προϊόν) > Δείγμα 2(ενδιάμεσο προϊόν) και Δείγμα 9(τελικό προϊόν) > Δείγμα 7(απόρριμμα)



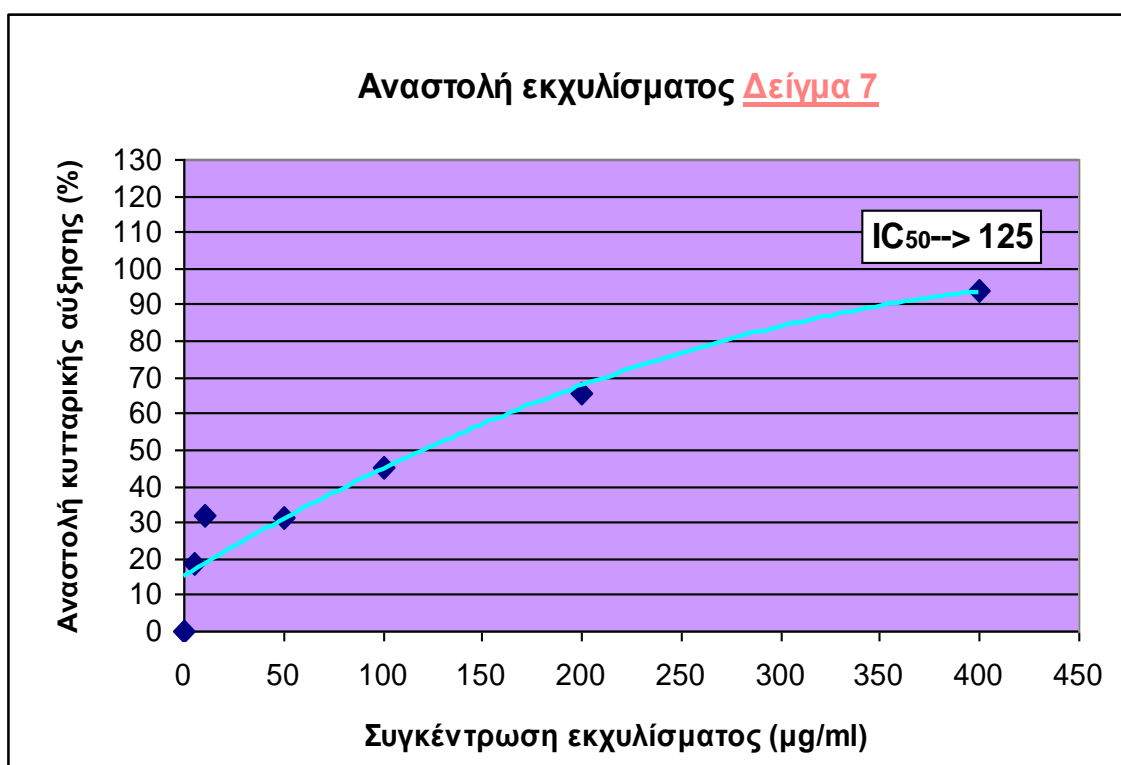
Γράφημα 3. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 2 (ενδιάμεσο προϊόν - επισπέρματα με λίγες φλούδες)



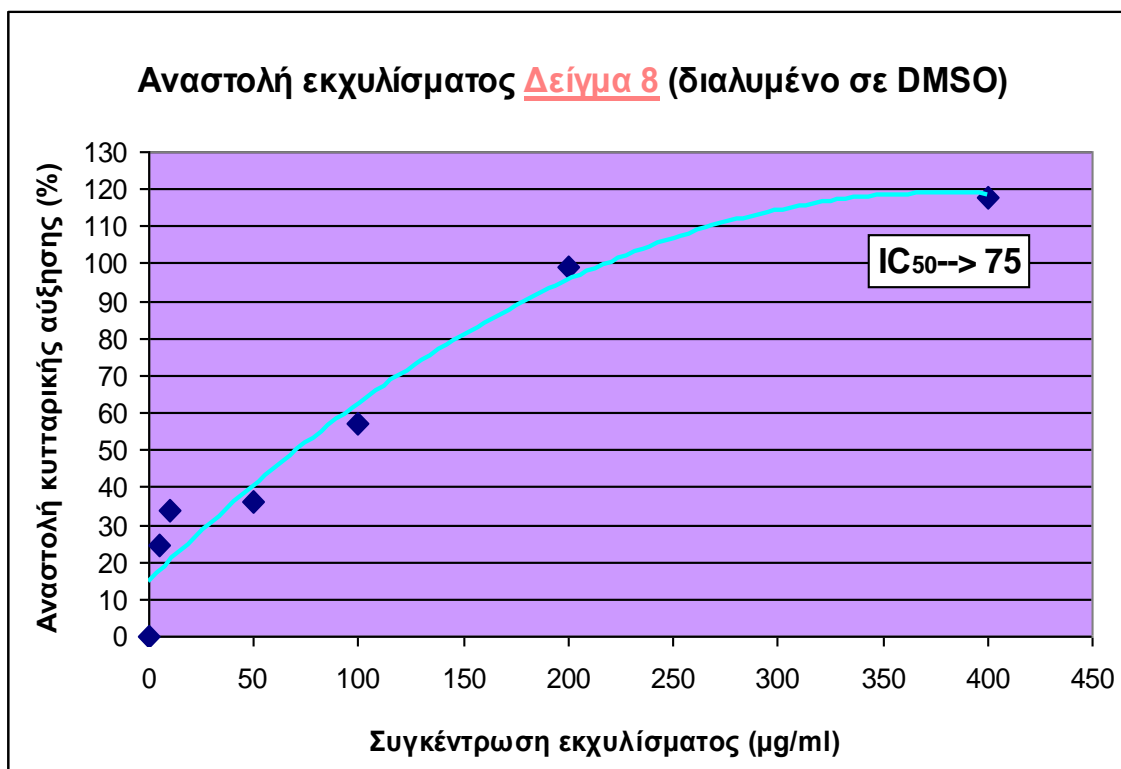
Γράφημα 4. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός)



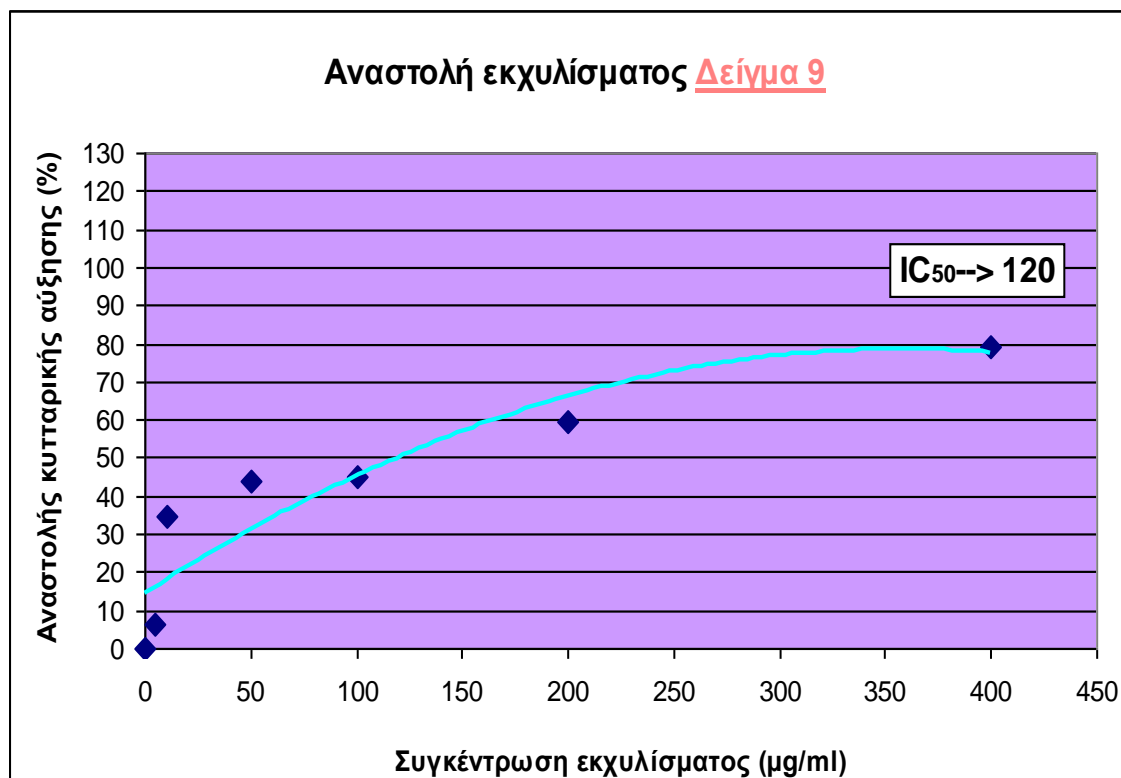
Γράφημα 5. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 6 (ενδιάμεσο προϊόν - πούλπα με λιγότερα στερεά)



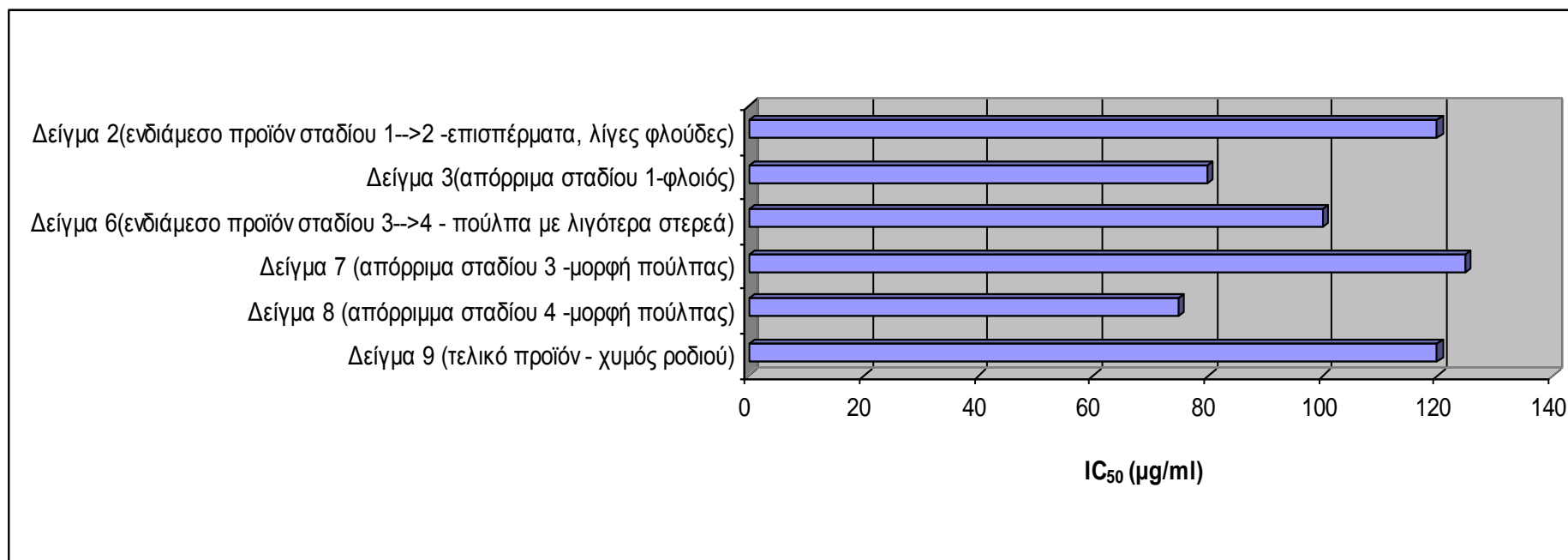
Γράφημα 6. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 7 (απόρριμμα - μορφή πούλπας)



Γράφημα 7. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 8 (απόρριμμα - μορφή πούλπας)



Γράφημα 8. Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των MCF-7 κυττάρων από το Εκχύλισμα 9 (τελικό προϊόν - χυμός ροδιού)



Γράφημα 9. Γραφική απεικόνιση των τιμών του IC₅₀ των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν σε µg/ml.

3.2 Κυτταρομετρία Ροής

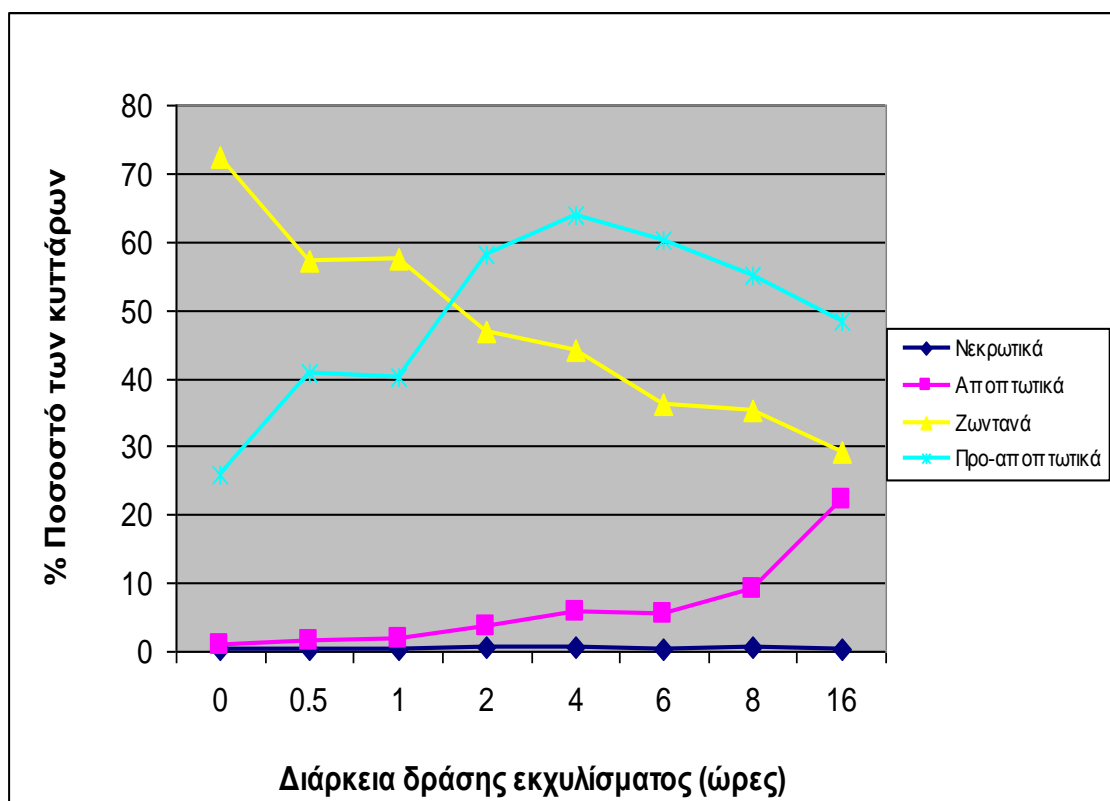
3.2.1 Πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 σε συνάρτηση με το χρόνο

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η πρόκληση της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 από το εκχύλισμα 3 (απόρριμμα - φλοιός), σε συνάρτηση με το χρόνο και συγκεκριμένα έπειτα από τη δράση του σε 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 και 16 ώρες. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα επιλέχθηκε καθώς ήταν από τα πιο ισχυρά, με υψηλή αντικαρκινική ικανότητα, και η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν λόγω του ότι ήταν πολύ κοντά στο IC₅₀ του εκχυλίσματος. Η διαδικασία του πειράματος έγινε σε τέσσερις επαναλήψεις για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας και την ορθότητα των συμπερασμάτων μας.

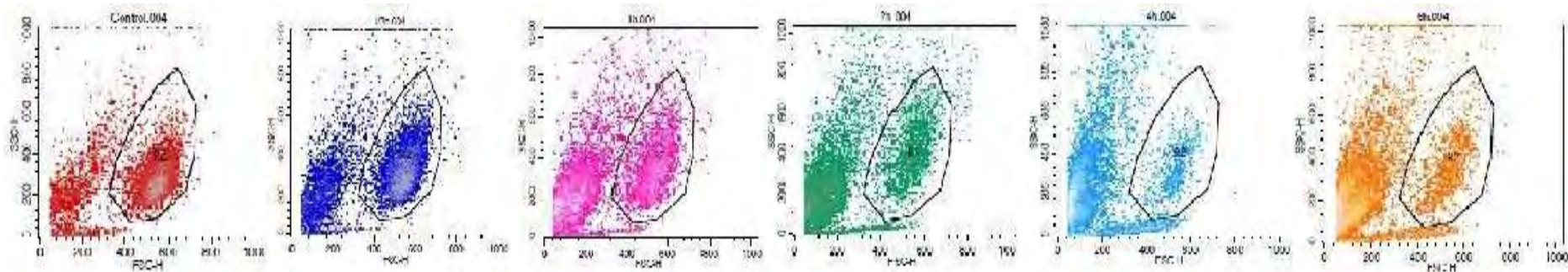
Στο γράφημα 10 βλέπουμε την πρόκληση απόπτωσης από την επίδραση του εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συνάρτηση με το χρόνο. Σημαντική είναι όπως βλέπουμε η πτώση των ζωντανών κυττάρων του πληθυσμού που συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των προ-αποπτωτικών κυττάρων. Το φαινόμενο ολοκληρώνεται με σταδιακή αύξηση των αποπτωτικών και των νεκρωτικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια εξέλιξης του φαινομένου το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων του πληθυσμού μας, των προ-αποπτωτικών κυττάρων, των αποπτωτικών και των νεκρών άλλαξε, με τα ζωντανά να ξεκινούν από 72% επί του πληθυσμού και να μειώνονται στο 57,2%, 44,1% και τέλος στο 29,1% έπειτα από 16 ώρες δράσης του εκχυλίσματος. Τα προ-αποπτωτικά κύτταρα από την άλλη αυξάνονταν σταδιακά από το 26% του πληθυσμού που ήταν χωρίς τη δράση του εκχυλίσματος σε 40,8%, 58,2% έως 63,8% έπειτα από 4 ώρες δράσης του εκχυλίσματος. Αυτό το ποσοστό ήταν το μεγαλύτερο καθώς έπειτα παρατηρήθηκε μια μείωση στο 55% έως και 48,3% επί του πληθυσμού έπειτα από 16 ώρες, γεγονός που συνοδεύεται με παράλληλη αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων από το 1% σε 3%, 5,5% έως 22,1% έπειτα από τη δράση 16 ωρών του εκχυλίσματος. Τέλος, τα νεκρά κύτταρα του πληθυσμού αρχικά ήταν στο 0,4% του πληθυσμού ενώ με το πέρασμα του χρόνου αυξήθηκαν σε 0,44%, 0,64% και 0,53% στις 16 ώρες.

Στις εικόνες 31 και 32 δίνονται κάποια αντιπροσωπευτικά διαγράμματα που μας έδωσε το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής και απεικονίζουν τα φυσικά

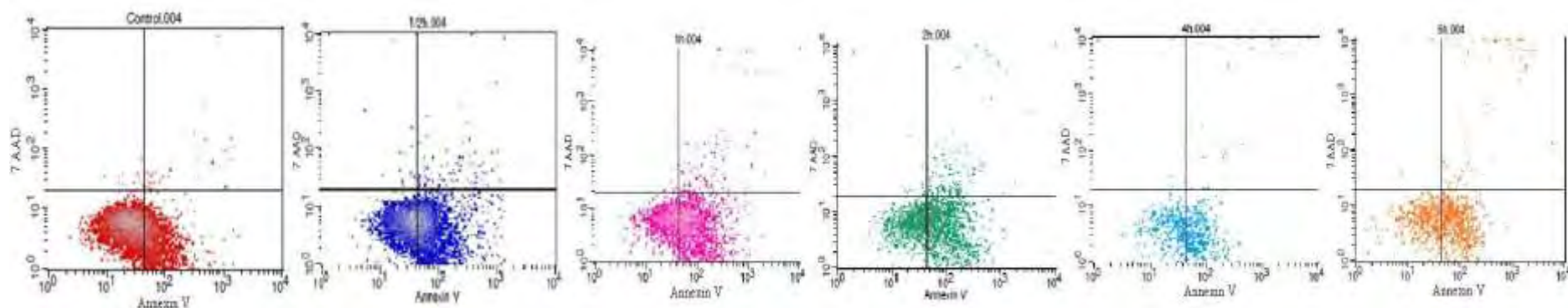
χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου πληθυσμού των κυττάρων που επιλέξαμε καθώς και το πλήθος των κυττάρων που αντέδρασαν στη χρωστική της απόπτωσης (Annexin V και 7-AAD). Στην εικόνα 31 παρατηρούμε τη σταδιακή μείωση του μεγέθους του πληθυσμού που οφείλεται στην κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος έπειτα από τις πολλές ώρες δράσης του. Στην εικόνα 32 παρατηρούμε με το πέρασμα του χρόνου τη σταδιακή μετακίνηση του πληθυσμού από το κάτω αριστερό τεταρτημόριο προς το κάτω δεξιά, πάνω δεξιά και τέλος πάνω αριστερά που μας δείχνει την εξέλιξη του φαινομένου της απόπτωσης και πως τα κύτταρα από ζωντανά μετατρέπονται σε προ-αποπτωτικά, σε αποπτωτικά και τέλος σε νεκρά αντίστοιχα.



Γράφημα 10. Επίδραση του Εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50µg/ml στην πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 σε συνάρτηση με το χρόνο(0ώρες=Control).



Εικόνα 31. Αντιπροσωπευτικές εικόνες που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επωάστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες.

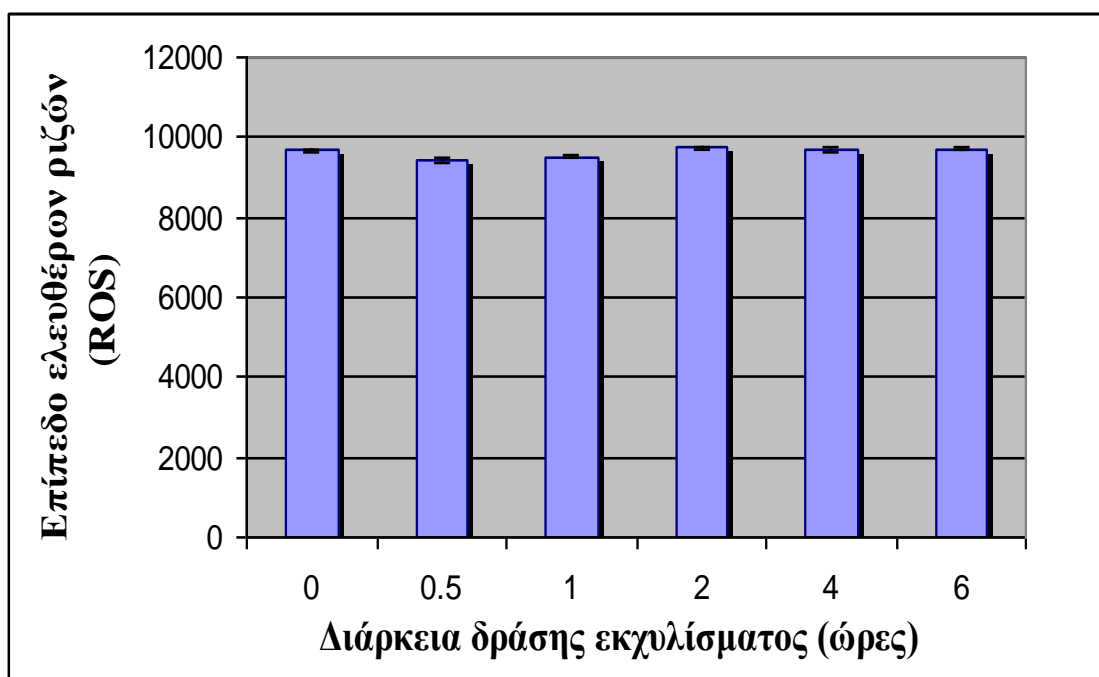


Εικόνα 32. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μελέτης της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με Annexin V και 7AAD των MCF-7 κυττάρων που επωάστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , για 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Κάθε τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει διαφορετική κατάσταση των κυττάρων. Το κάτω αριστερά τετράγωνο δείχνει τα ζωντανά κύτταρα του πληθυσμού, το κάτω δεξιά δείχνει τα προ-αποπτωτικά κύτταρα του πληθυσμού, το πάνω δεξιά δείχνει τα αποπτωτικά κύτταρα και τέλος το πάνω αριστερά δείχνει τα νεκρωτικά κύτταρα.

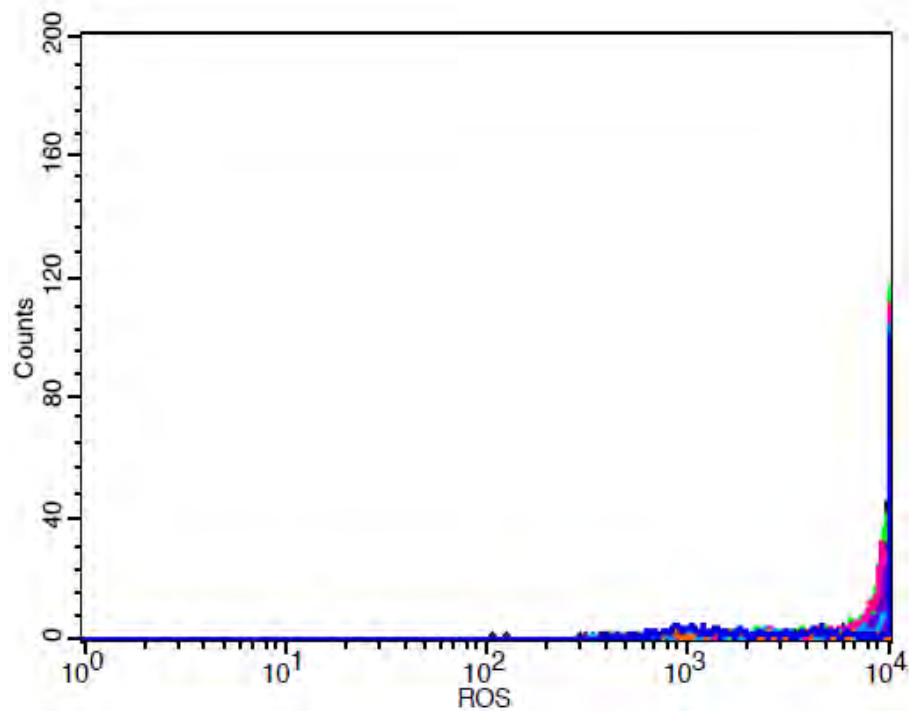
3.2.2 Προσδιορισμός των επιπέδων των ελεύθερων ριζών (ROS) στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα σε συνάρτηση με το χρόνο







Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 έπειτα από τη δράση του ίδιου εκχυλίσματος όπως στην απόπτωση, του εκχυλίσματος 3 για 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και σε συγκέντρωση 50μg/ml. Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DCF. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας. Τα αποτελέσματα που βρήκαμε όπως φαίνεται και στο γράφημα 11 είναι ότι τα επίπεδα των ROS ήταν πολύ υψηλά αλλά παρέμειναν σταθερά, χωρίς να παρατηρηθεί αυξομείωση με το πέρασμα του χρόνου δράσης του εκχυλίσματος.

Στο γράφημα 12 επίσης φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας τα έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής, όπου φαίνεται καθαρά ότι οι καμπύλες που αντιστοιχούν στις διαφορετικές χρονικές στιγμές συμπίπτουν η μία με την άλλη και άρα δεν υπήρξε μεταβολή στα επίπεδα των ROS.

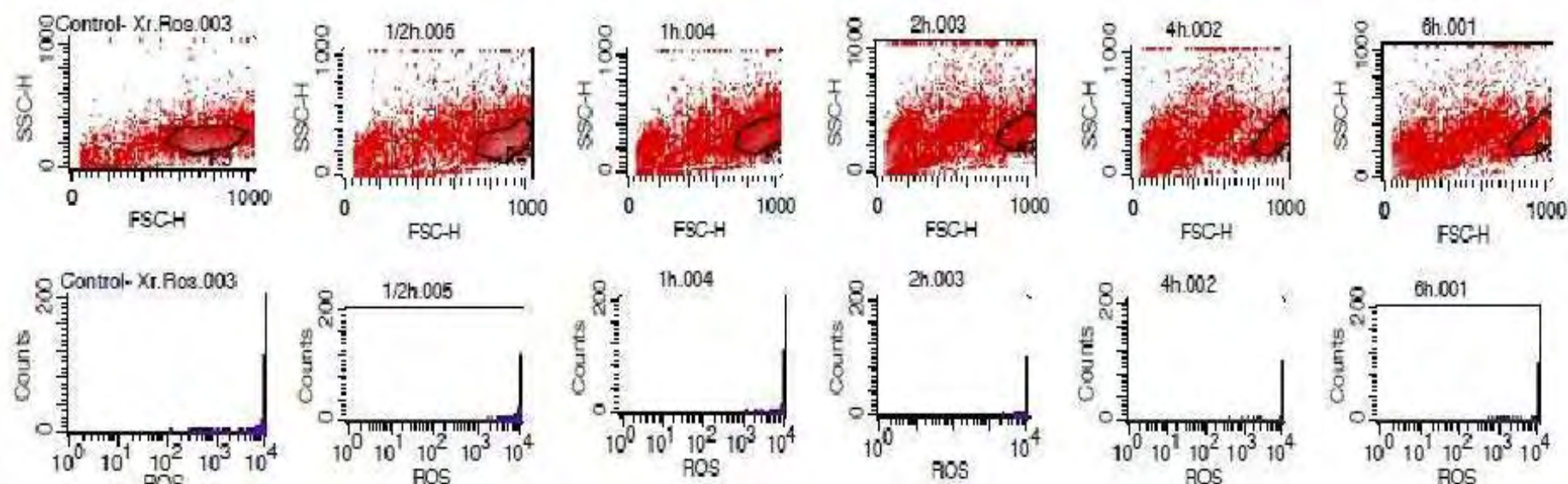


Γράφημα 11. Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 υπό την επίδραση του Εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml και σε συνάρτηση με το χρόνο (0ώρες=Control).



Key	Name	Parameter	Gate
	Control- Xr.Ros.003	FL1-H	G3
	1/2h.005	FL1-H	G3
	1h.004	FL1-H	G3
	2h.003	FL1-H	G3
	4h.002	FL1-H	G3
	6h.001	FL1-H	G3

Γράφημα 12. Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) σε όλες τις χρονικές στιγμές, από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.

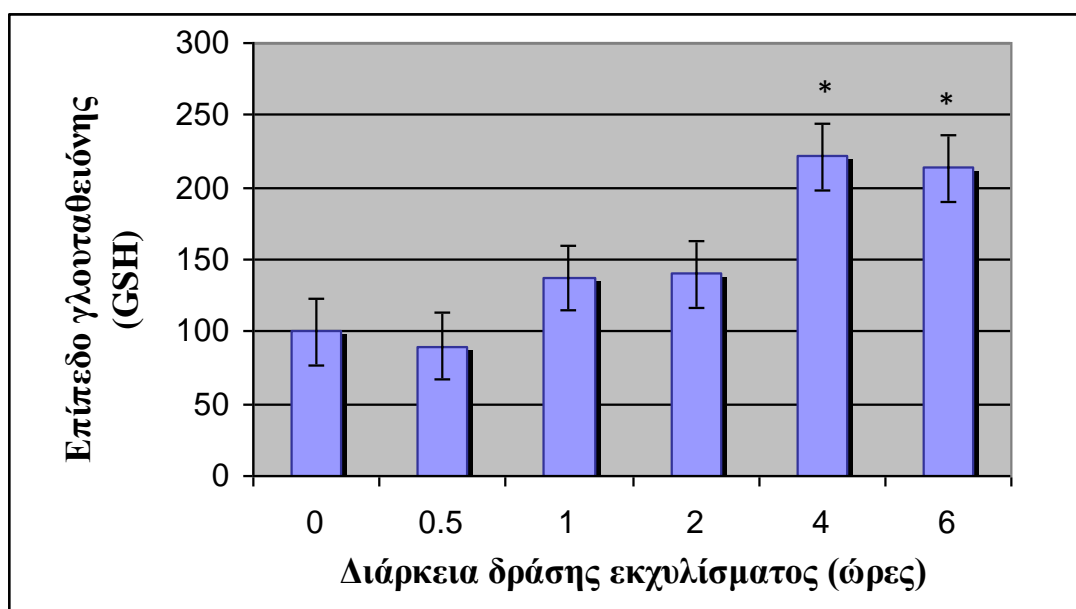


Εικόνα 33. Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν στην πάνω σειρά την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και στην κάτω σειρά την αντίστοιχη γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) στα ίδια κύτταρα έπειτα από την ίδια μεταχείριση.

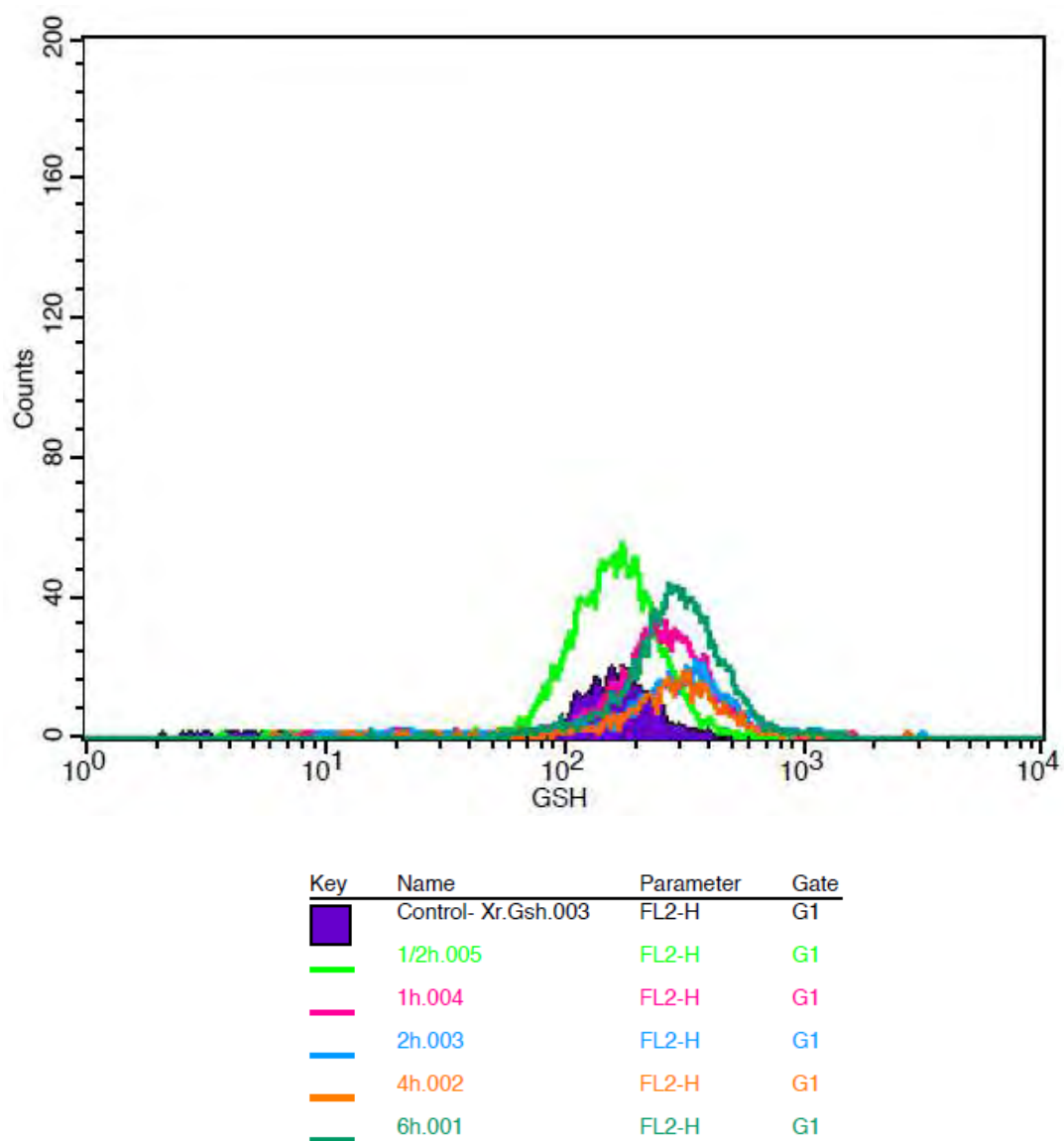
3.2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα σε συνάρτηση με το χρόνο

Με τη μέθοδο επίσης της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 υπό την επίδραση του ίδιου εκχυλίσματος, του εκχυλίσματος 3, έπειτα από 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και σε συγκέντρωση 50μg/ml. Η μέθοδος εφαρμόστηκε με τη βοήθεια της χρωστικής Mercury Orange. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές για την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας. Τα αποτελέσματα που βρήκαμε όπως φαίνεται και στο γράφημα 13 είναι ότι τα επίπεδα της GSH ήταν χρονικά εξαρτώμενα και καθώς αυξάνονταν η χρονική διάρκεια δράσης του εκχυλίσματος, αυξάνονταν και τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Κάνοντας στατιστική ανάλυση στις τιμές βρήκαμε ότι οι τιμές στη χρονική διάρκεια 4 και 6 ωρών ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές σε σύγκριση με το control (0 ώρες).

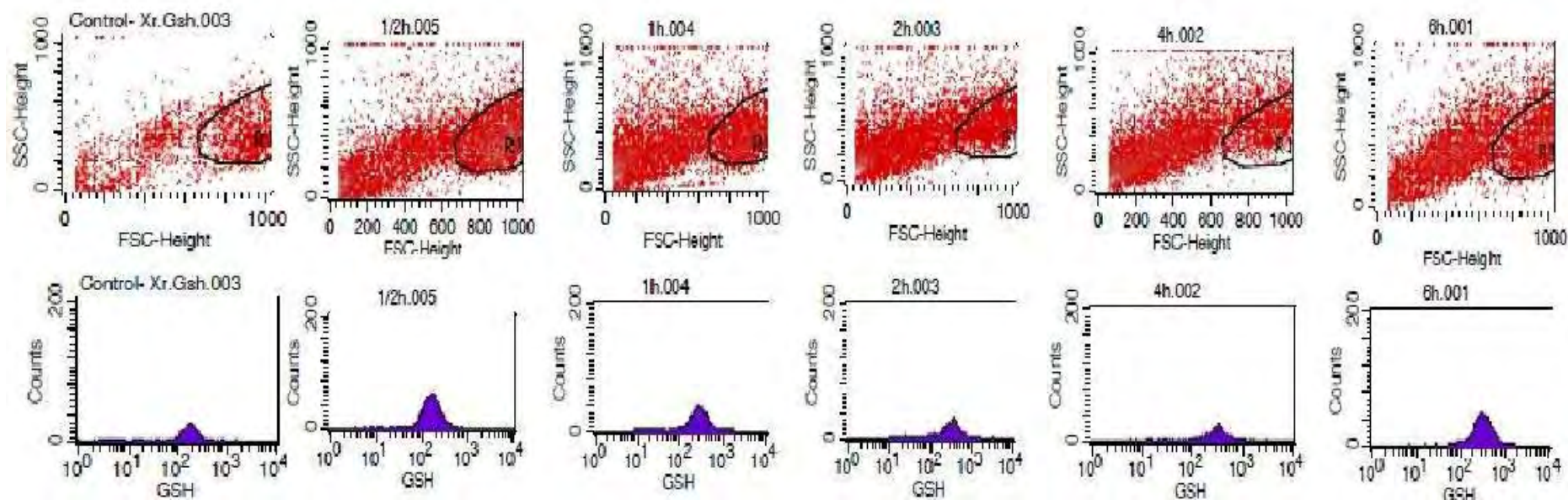
Στο γράφημα 14 τέλος, φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα όπως μας τα έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής όπου φαίνεται η μετατόπιση της καμπύλης όσο αυξάνεται η χρονική διάρκεια δράσης του εκχυλίσματος σε σχέση με το control (0 ώρες).



Γράφημα 13. Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 υπό την επίδραση του εκχυλίσματος 3 (απόρριμμα - φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml και σε συνάρτηση με το χρόνο (0ώρες=Control). (*) στατιστικά σημαντικές τιμές σε σχέση με την τιμή του Control (t=0) ($P<0,05$).



Γράφημα 14. Συγκεντρωτικό γράφημα των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) σε όλες τις χρονικές στιγμές, από το λογισμικό της κυτταρομετρίας ροής.



Εικόνα 34. Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν στην πάνω σειρά την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων MCF-7 που επώαστηκαν με το Εκχύλισμα 3 (απόρριμμα-φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml , κατά 0, 0.5, 1, 2, 4 και 6 ώρες και στην κάτω σειρά την αντίστοιχη γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) στα ίδια κύτταρα έπειτα από την ίδια μεταχείριση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

‘Συζήτηση – Συμπεράσματα’

4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Μία από τις σημαντικότερες ασθένειες των τελευταίων ετών είναι ο καρκίνος. Συμπεριλαμβανομένων όλων των μορφών του είναι η δεύτερη αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πόσο σημαντική είναι μία μελέτη όσον αφορά την πρόσληψη αλλά και τη θεραπεία αυτής της ασθένειας. Οι έρευνες τα τελευταία χρόνια έχουν στραφεί στη δράση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων που έχουν τροφές της καθημερινότητάς μας που δεν τους είχε δοθεί η κατάλληλη σημασία. Αυτοί οι παράγοντες οφείλονται στα φυτοχημικά συστατικά που περιέχουν σχεδόν όλα τα φρούτα και τα λαχανικά της διατροφής μας τα οποία όμως είχαν αρχίσει να σιγά σιγά να χάνονται από το διαιτολόγιό μας. Έτσι λοιπόν χημειοπροστασία είναι η πρόληψη της ασθένειας αλλά και άλλων ασθενειών με την πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών μέσω της δίαιτάς μας ή συμπληρωμάτων διατροφής. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις, οι οποίες έχουν αποδοθεί στις περιεχόμενες φυτοχημικές ενώσεις (Kris - Etherton et all, 2002; Valko et all, 2007). Συγκεκριμένα οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές / φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και είναι εκείνες οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Bidlack et all, 2000). Οι πολυφαινόλες, αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et all, 2000).

Έτσι λοιπόν και στην έρευνά μας μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων των προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων παραγωγής χυμού ροδιού σε καρκινικά κύτταρα του μαστού της σειράς MCF-7. Όπως μας έχει δείξει και η βιβλιογραφία, πολλές έρευνες κατέδειξαν τις αντικαρκινικές ιδιότητες του ροδιού σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων (Longtin, 2003). Συγκεκριμένα σε δύο σειρές καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7 και MB-MDA-231) έχει βρεθεί η ανασταλτική δράση του φυσικού χυμού ροδιού λόγω των πολυφαινολών του (Adhami and Mukhta, 2006). Όπως φαίνεται και στα δικά μας αποτελέσματα (γράφημα 3 - 8) η αναστολή της αύξησης των καρκινικών μας κυττάρων (MCF-7) ήταν δόσοεξαρτώμενη και όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος τόσο αυξάνονταν και η αναστολή. Για να συγκρίνουμε καλύτερα αυτά τα αποτελέσματα προσδιορίσαμε το IC₅₀ των εκχυλισμάτων αυτών, δηλαδή τη

συγκέντρωση με την οποία προκαλείται αναστολή της αύξησης των κυττάρων κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο μεγαλύτερη είναι η αντικαρκινική ικανότητα του εκχυλίσματος. Συνεπώς, από το γράφημα 9 συμπεραίνουμε πως το πιο ισχυρό εκχύλισμα είναι το Δείγμα 8 (απόρριμμα σταδίου 4 - μορφή πούλπας) με IC_{50} στα 75μg/ml και δεύτερο να ακολουθεί το Δείγμα 3 (απόρριμμα σταδίου 1 - φλοιός) με IC_{50} 80μg/ml. Αυτό δικαιολογείται άλλωστε και από την αρχική μας υπόθεση για τις ιδιότητες και τη συγκέντρωση των πολυφαινολών γιατί όπως παρατηρούμε στον πίνακα 5 και στο γράφημα 1 καθώς και στον πίνακα 6 και στο γράφημα 2 αυτά τα δύο εκχυλίσματα είχαν τη μεγαλύτερη αναλογία σε ολικά φαινολικά και ολικά φλαβονοειδή σε σχέση με τα υπόλοιπα. Αυτό εξηγείται επίσης γιατί τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ήταν από απορρίμματα της γραμμής παραγωγής, πράγμα που σημαίνει φλούδια, σπόρια και διάφορα άλλα υπολείμματα το οποία όπως έχει βρεθεί σε διάφορες έρευνες περιέχουν πολυφαινόλες και διάφορα άλλα δραστικά συστατικά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το χυμό του ροδιού. Στα υπόλοιπα εκχυλίσματα οι τιμές του IC_{50} κυμαίνονται από 100μg/ml έως 125μg/ml στο λιγότερο δραστικό εκχύλισμα. Από αυτό, συμπεραίνουμε ότι από τη γραμμή παραγωγής ναί μεν το τελικό προϊόν έχει ισχυρή αντικαρκινική ιδιότητα αλλά επίσης και τα απορρίμματα της γραμμής παραγωγής έχουν παρόμοιες ιδιότητες, γεγονός που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί αργότερα.

Στη συνέχεια της μελέτης μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής για να προσδιοριστεί ο τρόπος δράσης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων. Από τη βιβλιογραφία ξέρουμε ότι οι σημαντικότερες χημειοπροστατευτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι η ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση (Ramos, 2007; Sun et al, 2004). Οι ιδιότητες αυτές έχουν παρατηρηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες (Sun et al, 2004; Galati et al, 2000). Μελετήσαμε έτσι την πρόκληση απόπτωσης του Δείγματος 3 (απόρριμμα σταδίου 1 - φλοιός) σε συγκέντρωση 50μg/ml (τιμή κοντά στο IC_{50}) και σε συνάρτηση με το χρόνο και είδαμε ότι αυξάνεται σταδιακά. Καθώς μεγάλωνε το χρονικό διάστημα της δράσης του εκχυλίσματος το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνονταν (από 1% αρχικά, σε 3%, 5,5% έως 22,1% του πληθυσμού). Επίσης, καθώς αυξάνονταν το χρονικό διάστημα της δράσης του εκχυλίσματος παρατηρούνταν μια μείωση των ζωντανών κυττάρων του πληθυσμού (από 72%, σε 57,2%, 44,1% και τελικά στο 29%) και μια παράλληλη αύξηση των προ-αποπτωτικών κυττάρων μέχρι ένα χρονικό

σημείο όπου είχαμε μια μέγιστη τιμή (από 26%, σε 40%, 58,2% και 63%) και στη συνέχεια ακολουθούσε μία μείωση (στο 55% και 48%) γιατί τα κύτταρα εισέρχονταν στη φάση της απόπτωσης. Σταδιακή αύξηση επίσης παρατηρήθηκε και στα νεκρά κύτταρα του πληθυσμού (από 0,4%, σε 1,44%, 0,64% και 0,53% του πληθυσμού) καθώς αυξανόταν η δράση του εκχυλίσματος που ήταν απολύτως φυσιολογικό. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως το συγκεκριμένο εκχύλισμα επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων MCF-7 (γράφημα 10).

Η πρόκληση της απόπτωση θεωρείται ένας σημαντικός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός γι' αυτό και έχουν γίνει εκτενείς έρευνες πάνω σε αυτό το πεδίο. Από άλλες έρευνες που έχουν γίνει, έχει βρεθεί ότι το ελαγικό οξύ που περιέχεται στο χυμό του ροδιού, προκαλεί απόπτωση (Sturgeon and Ronnenberg, 2010). Από τις πολυφαινόλες που ανιχνεύτηκαν στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα έχει αναφερθεί ότι και η κερκετίνη προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Σε μοριακό επίπεδο τα φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ότι αλληλεπιδρούν με μόρια της μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την αποπτωτική διαδικασία (π.χ. κασπάσες και Bcl-2) (Ramos, 2007).

Έχει προταθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες (ROS) ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση κατά το στάδιο της προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας (Slater et al, 1995; Burdon, 1995; Cerutti, 1985). Η ιδιότητα αυτή είναι αρκετά περίπλοκη και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή της απόπτωσης ή νέκρωσης των κυττάρων ενώ η χαμηλή συγκέντρωσή τους επηρεάζει σηματοδοτικά μονοπάτια, τη γονιδιακή έκφραση όπως την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Klaunig and Kamendulis, 2004; Das, 2002). Οι ROS που παράγονται μέσω της προοξειδωτικής δράσης των πολυφαινόλων μπορούν να οδηγήσουν στον κατακερματισμό του DNA και στην απόπτωση. Έτσι οι πολυφαινόλες μέσω της προοξειδωτικής τους δράσης μπορούν να οδηγήσουν στην επαγωγή της απόπτωσης, δρώντας χημειοπροστατευτικά (Hadi et al, 2000; Ramos, 2007).

Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα οδηγούν στην απόπτωση και στον κατακερματισμό του DNA μέσω ελευθέρων ριζών (Hadi et al, 2007; Hail et al, 2008). Γι' αυτό και εμείς στη συνέχεια του πειράματός μας μελετήσαμε τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών στα καρκινικά κύτταρα έπειτα από την επίδραση του εκχυλίσματος Δείγμα 3 (απόρριμμα σταδίου 1 - φλοιός) σε συνάρτηση με το χρόνο.

Τα αποτελέσματα που βρήκαμε ήταν ότι τα επίπεδα των ROS ήταν μεν υψηλά στα καρκινικά κύτταρα αλλά δεν παρατηρήθηκε αύξηση ή μείωση έπειτα από τη δράση του εκχυλίσματος σε καμία χρονική στιγμή (γράφημα 11). Επίσης, ένας άλλος δείκτης οξειδωτικού στρες είναι και η μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) που θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια των κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν με την πάροδο του χρόνου στη δράση του εκχυλίσματος τα επίπεδα της γλουταθειόνης αυξάνονταν στα κύτταρα κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι αυτή είναι μία από τις αιτίες πρόκλησης της απόπτωσης. (γράφημα 13). Με βάση τα αποτελέσματά θεωρούμε ότι αν και δεν υπήρξε μεταβολή στα επίπεδα των ROS, ωστόσο ίσως το εκχύλισμα να είχε προοξειδωτική δράση στα κύτταρα τα οποία ενεργοποίησαν τη σύνθεση γλουταθειόνης ως προσαρμοστικό μηχανισμό. Η αύξηση της γλουταθειόνης εξουδετέρωσε την προοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος και για αυτό δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα των ROS από τη δράση του εκχυλίσματος. Βέβαια, για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης χρειάζονται επιπλέον πειράματα όπου θα μπορούσε για παράδειγμα να προστεθεί στα κύτταρα ένας αναστολέας της σύνθεσης της γλουταθειόνης παράλληλα με την προσθήκη του εκχυλίσματος και στη συνέχεια να προσδιοριστούν τα επίπεδα των ROS.

Μελετώντας τη διεθνή βιβλιογραφία, όπως αναφέραμε πολλές έρευνες έχουν δείξει αντικαρκινικές ιδιότητες του χυμού του ροδιού σε διάφορες καρκινικές σειρές. Το αξιοσημείωτο της συγκεκριμένης έρευνας είναι ότι μελετήθηκαν και τελικά αποδείχθηκαν για πρώτη φορά οι αντικαρκινικές ιδιότητες όλων των σταδίων παραγωγής χυμού ροδιού και όχι μόνο το τελικό προϊόν. Δείξαμε έτσι ότι τα παραπροϊόντα και ιδιαίτερα τα απορρίμματα μιας βιομηχανίας χυμού ροδιού, τα οποία είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, είναι αξιοποιήσιμα και άξια περεταίρω μελέτης. Τα απόβλητα συνεπώς μιας τέτοιας βιομηχανίας που είναι επιβαρυντικά και για τη βιομηχανία σε οικονομικό επίπεδο και για το περιβάλλον σε οικολογικό επίπεδο, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν, απομονώνοντας τις δραστικές ουσίες για να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή νέων προϊόντων (π.χ. βιολειτουργικά τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής) ή εμπλουτισμό του δικού τους τελικού προϊόντος. Γι' αυτό βέβαια απαιτούνται επιπλέον πειράματα με αυτό τον προσανατολισμό (π.χ. ποια είναι η συνιστώμενη ημερήσια δόση που επιφέρει αποτέλεσμα και δεν είναι τοξική) όπου τα αποτελέσματά τους θα είναι χρήσιμα και θα βοηθήσουν τη βιομηχανική παραγωγή και τελικά την υγεία του ανθρώπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

‘Βιβλιογραφία’

5.1 Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αλαχιώτης Σ., 2005, 'Εισαγωγή στη Γενετική', Ελληνικά Γράμματα Α.Ε., Αθήνα
2. Κιτράκη Ε. και Τρούγκος Κ., 2006, 'Βιολογία του καρκίνου', Ιατρικές εκδόσεις 'Π.Χ. Πασχαλίδης', 2^η έκδοση
3. Κουρέτας Δ., 2003, 'Βιοχημική Τοξικολογία', Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
4. Μπέσιος Α., 2012, 'Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με χρήση μοριακών μεθόδων σε πολυφαινολικά εκχυλίσματα προϊόντων και παραπροϊόντων των σταδίων παραγωγής χυμού από καρπούς του φυτού ροδιά (*Punica granatum*), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα
5. Νακοπούλου Α, Μιχαλοπούλου Α., 1997, 'Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία.', Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14
6. Σπανού Χρυσούλα, 2010, 'Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Λάρισα

5.2 Ξένη Βιβλιογραφία

7. Adhami V.M., Khan N., Mukhtar H., 2009, 'Cancer Chemoprevention by Pomegranate: Laboratory and Clinical Evidence', Nutrition and Cancer, 61(6), 811–815
8. Adhami V.M., Mukhtar H., 2007, 'Anti-Oxidants from Green Tea and Pomegranate for Chemoprevention of Prostate', CancerMol Biotechnol 37:52–57
9. Al-Maiman S.A., Ahmad D., 2002, 'Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation', Food Chem. 76:437–441
10. Al-Said F.A, Opara L. and Al-Yahyai R., 2009, 'Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman', Journal of Food Engineering 90:129-134
11. Andersen Ø.M., Markham K.R., 2006, 'Flavonoids, Chemistry, biochemistry and applications.', CRC Press Taylor & Francis

12. Aviram M, Dornfeld L, 2003, "Methods of using pomegranate extracts for causing regression in lesions due to arteriosclerosis in humans", US Patent 6,641
13. Basu A. and Penugonda K., 2009, "Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice", *Nutrition Reviews* 67(1):49–56
14. Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L., 1998 , "Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity.", *Drugs Exp Clin Res.* 24:133–138
15. Biale J.B., 1960, "The postharvest biochemistry of tropical and subtropical fruits", *Adv. Food Res.* 10:293–354
16. Bidlack WR, Omay ST, Meskin MS, Topham DKW, 2000, "Phytochemicals as bioactive agents.", CRC Press
17. Burdon R.H., 1995, "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation.", *Free Radic Biol Med* 18: 775-94
18. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R., 1992, "Cell death by apoptosis and its protective role against disease.", *Trends Pharmacol Science* 13:245-251
19. Cairns J., 1975, "Mutation selection and the natural history of cancer", *Nature*, 255: 197-200
20. Cavalli L.R., Liang B.D., 1998, "Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved?", *Mutation Pres* 398: 19–26
21. Cerutti P.A., 1985, "Prooxidant states and tumor promotion.", *Mutation Research* 227: 375-81
22. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F., Finetti P., Adelaide J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F., 2006, "Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers", *Oncogene* 25(15): 2273-2284
23. Cheynier V., 2005, "Polyphenols in foods are more complex than often thought.", *American Journal Clinical Nutrition*, 81:223-9
24. Cotgreave I. A., Moldeus P., Orrenius S., 1988, "Host biochemical defense mechanisms against prooxidants.", *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 189-212
25. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara J., 2008, "Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet.", Blackwell Publishing, *Phytochemistry* Volume 69, p. 1288

26. Das U.N., 2002, "A radical approach to cancer.", *Med Sci Monit* 8: 79-92
27. De Flora S., Ferguson L., 2005, "Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents.", *Mut Res*, 591: 8-15
28. Dive C., Gregory C.D., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E. and Wyllie A.H., 1992, "Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry", *Biochemica et Biophysica Acta*, 1133: 275-285
29. Drogoudi, P.D., Tsipouridis C. and Michailidis Z., 2005, "Physical and chemical characteristics of pomegranates", *HortScience* 40 (5):1200–1203
30. Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN., 1998, "Anticarcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis.", *Carcinogenesis*. 9:331-332
31. Glodek, Cass, Ph.D., 1990, "A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement", Michigan Cancer Foundation, Detroit, page 68
32. Hadi S.M., Asad S.F., Singh S., Ahmad A., 2000, "Putative mechanism of anticancer and apoptosis-inducing properties of plant derived polyphenolic compounds.", *IUBMB Life* 50: 167-171
33. Hadi S.M., Bhat S.H., Azmi A.S., Hanif S., Shamim U., Ullah M.F., 2007, "Oxidative breakage for cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties.", *Sem Cancer Biol* 17: 370-376
34. Haidari M., Ali M., Casscells S.W. III, Madjid M., 2009, "Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir", *Phytomedicine* 16:1127–1136
35. Hail Jr.N., Cortes M., Drake E.N., Spallholz J.E., 2008, "Cancer chemoprevention: A radical perspective.", *Free Rad Biol Med* 45: 97-110
36. Hennings H., Shores R., Wenk M.L., Spangler E.F, Tarone R. and Yuspa S.H., 1983, "Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters", *Nature*, 304: 67-69
37. Hill DL., Grubbs CJ., 1992, "Retinoids and cancer prevention.", *Annu Rev Nutr.* 12:161-181
38. <http://www.nih.gov/>)
39. Huang F.L., Roop D.R., De Luca L.M., 1986, "Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea.", *In Vitro Cell Dev Biol.* 22:223

40. Huang MT., Lysz T., Ferraro T., Abidi TF., Laskin JD., Conney AH., 1991, "Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis.", *Cancer Res.* 51:813-819
41. Hui Y., Barta J., 2006, "Handbook of fruits and fruit processing, Wiley-Blackwell Publishing, p. 166, 209-210
42. Ismail T., Sestili P., Akhtar S., 2012, "Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects", *Journal of Ethnopharmacology* 143:397–405
43. Jordan VC., 1992, "The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer." *Cancer* 70:977s-982s
44. Kalka K., Ahmad N., Criswell T., Boothman D., Mukhtar H., 2000, "Up-regulation of clusterin during phthalocyanine-4 photodynamic therapy mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors.", *Cancer Research* 60(21) 5984–5987
45. Kelloff GJ., Hawk ET., Sigman CC., 2005, "Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention.", Vol e. Humana Press
46. Kennedy AR., 1998, "Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther.* 78:167-209
47. Kesaria R., Trivedia P. K., Nath P., 2007, "Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue", *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 136-143
48. Kevin J. Harrington, 2011, "Biology of cancer", Elsevier, *Medicine* 39:689-692, *Oncology*: part 1 of 2
49. Khan N., Adhami V.M. and Mukhtar H., 2010, "Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer.", *Endocrine- Related Cancer* 17(1): R39–R52
50. Khan N., Afaq F., Mukhtar H., 2007, "Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth.", *Carcinogenesis* 28:233-9
51. Klaunig J.E., Kamendulis L.M., 2004, "The role of oxidative stress in carcinogenesis.", *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 239-67
52. Kris Etherton P.M., Hecker K.D, Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D., 2002, "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer.", *Am J Med* 113:S71-88
53. Kulkarni A.P., Aradhya S.M., 2005, "Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development.", *Food Chemistry*, 93, 319–324

54. Labayle D., Fischer D., Vielh P., Drouhin F., Pariente A., Bories C., Duhamel O., Troussset M., Attali P., 1991, "Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis.", *Gastroenterology*. 101:635-639
55. Lacroix M., Leclercq G., 2004, "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.", *Breast Research and Treatment* 83 (3): 249–289
56. Lacroix M., Toillon RA., Leclercq G., 2006, "p53 and breast cancer, an update", *Endocrine-Related Cancer* 13 (2): 293–325
57. Levenson AS., Jordan VC., 1997, "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line.", *Cancer Research* 57(15): 3071–3078
58. Lewin B., 2004, "GENES VIII", Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., Δεύτερος τόμος
59. Longtin R., 2003, "The pomegranate: Nature's power fruit?", *J Natl Cancer Inst*, 95:346–348
60. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004, "Polyphenols: food sources and bioavailability.", *Am J. Clin Nutr.* 79:727-747
61. Martinez J., Melgarejo P., Hernandez F., Salazar D.M. and Martinez R., 2006, "Seed characterization of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties.", *Scientia Horticulturae* 110:241-246
62. McKinnell R.G., Parchment R.E., Perantoni A.O. and Pierce G.B., 2000, "The Biological basis of Cancer", Cambridge University Press
63. Mehta RG., Murillo G., Naithani R., Peng X., 2010, "Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come?", *Pharmaceutical Research* 27:950–961
64. Meister A., Anderson M.E., 1983, "Glutathione.", *Annual Review of Biochemistry* 52: 711-60
65. Meskin M.S., Bidlack W.R., Davies A.J. and Omaye S.T., 2002, "Phytochemicals in nutrition and health.", CRC Press
66. Mousavi S.H., Tavakkol-Afshari J., Brook A., Jafari-Anarkooli I., 2009, "Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: Role of apoptosis", *Food and Chemical Toxicology* 47:855–859
67. Mousavinejad G., Emam-Djomeh Z., Rezaei K., Khodaparast M.H.H., 2009, "Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on

- antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars'', *Food Chemistry* 115:1274–1278
68. Na H., Kim E., Choi M., Park J., Kim D., Surh Y., 2012, ''Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1'', *Biochemical Pharmacology* 84:1241–1250
 69. Noda Y., Kaneyuka T., Mori A., Packer L., 2002, ''Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin'', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(1):166-71
 70. Orrenius S., 1993, ''Mechanisms of oxidative cell damage. In: Poli G., Albano E., and Dianzani, M.U. (eds) *Free radicals: From Basic Science to Medicine* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland p. 47–64
 71. Ozgen M., Durgac C.K., Serc S., Kaya C., 2008, ''Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey'', *Food Chemistry* 111: 703–706
 72. Parashar A., 2010, ''Lipid Content and Fatty Acid Composition of Seed Oils from Six Pomegranate Cultivars'', *International Journal of Fruit Science*, 10:425–430
 73. Potter VR., 1981, ''A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver'', *Carcinogenesis* 2: 1375-1379
 74. Ramos S., 2007, ''Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention'', *Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 427–442
 75. Reddy BS., Maruyama H., Kelloff G., 1987, ''Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development'', *Cancer Res* 47:5340-5346
 76. Robbins and Cotran, 2003, ''*Pathology Basis of Disease.*'', 7th ed, Elsevier, New York 26 – 32
 77. Ross DT., Perou CM., 2001, ''A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines'', *Diseases Markers* 17 (2): 99–109
 78. Russel P.R., 2009, ''iGenetics, Μια Μεντελική Προσέγγιση'', Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., Reed College, Δεύτερος τόμος
 79. Scalbert A., Williamson G., 2000, ''Dietary intake and bioavailability of polyphenols'', *J Nutr* 130:2073S-2085S

80. Schafer F.Q., Buettner G.R., 2001, "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.", *Free Rad Biol Med* 30: 1191-212
81. Seeram N., Lee R., Hardy M., Heber D., 2005, "Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry.", *Sep Purif Technol* 41:49-55
82. Shapiro H.M., 2003, "Practical Flow Cytometry, 4rth ed. Wiley-Liss, New Jersey
83. Shwartz E., Glazer I., Bar-Ya'akov I., Matityahu I., Bar-Ilan I., Holland D., Amir R., 2009, "Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions.", *Food Chemistry* 115, 965-973
84. Slater A.F., Stefan C., Nobel I., van den Dobbelen D.J., Orrenius S., 1995, "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis.", *Toxicology Letters* 82-83: 149-53
85. Soule HD., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., 1973, "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma", *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1409-1416
86. Stagos D., Amoutzias GD., Matakos A., Spyrou A., Tsatsakis AM., Kouretas D., 2012, "Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols" *Food Chemical Toxicology* 50(6):2155-70
87. Sturgeon S.R., Alayne G, Ronnenberg, 2010, "Pomegranate and breast cancer: possible mechanisms of prevention", *International Life Sciences Institute, Nutrition Reviews* 68(2):122-128
88. Sun S.Y., Hail N., Lotan R., 2004, "Apoptosis as a novel target of cancer chemoprevention.", *J Nat Cancer Inst* 69: 662-669
89. Syed D.N., Afaq F., Mukhtar H., 2007, "Pomegranate derived products for cancer chemoprevention", *Seminars in Cancer Biology* 17:377-385
90. Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraulc A., Contic M., Legrand A., 2000, "Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach.", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 373-384
91. Thun MJ., Jemal A., 2006, "Cancer epidemiology. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E III, editors. *Cancer 7 medicine*, Hamilton: BC Decker Inc: p.339-53
92. Trosko JE. and Chang CC., 1989, "Stem cell theory of carcinogenesis", *Toxicology Letters* 49:283-295

93. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007, ''Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.'', *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84
94. Vermeris W., Nicholson R., 2006, ''Phenolic compound biochemistry.'', Springer
95. Wainfan E., Poirier A., 1992, ''Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression'', *Cancer Res*, 52:2071-2077
96. Wainfan E., Dizik M., 1987, ''Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats.'', *Carcinogenesis*. 8:615-617
97. Wattenberg LW., 1985, ''Chemoprevention of cancer, *Cancer Res*, 45:1-8
98. West JD. and Marnett LJ., 2006, ''Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death.'', *Chem Res Toxicol* 19:173–194
99. Zareei, Mehdi, Azizi, ajid and Bashir-Sadr, Zeinolabedin, 2011, ''Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit during ripening Fruits'', *Cirad/EDP Sciences, Fruits* 66:121–129
100. Zhang LX., Cooney RV., Bertram JS., 1991, ''Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action.'', *Carcinogenesis* 12:2109-2114
101. Zhu J., Chen Z., Lallemand-Breitenbach V., de The H., 2002, ''How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic.'', *Nature Reviews Cancer* 2:705-713