

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

ΙΩΑΝΝΑ ΤΡΙΖΟΓΛΟΥ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΟΣΤΡΥΧΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΤΡΑΧΗΛΟΥ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (HeLa).

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Επίδραση εκχυλισμάτων από βοστρύχους στην αύξηση καρκινικών
κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (Hela)**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών
του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα πολύ ενδιαφέρον.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον λέκτορα κ. Στάγκο Δημήτριο για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές του εργαστηρίου προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς για την άριστη συνεργασία που είχαμε και την βοήθεια που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
<u>A' ΜΕΡΟΣ</u>	5-21
1) ΓΕΝΙΚΑ: ΣΤΑΦΥΛΙΑ.....	5
2) ΒΟΣΤΡΥΧΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.....	8
3) ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	9
4)ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	13-16
4α) Γενικά.....	13
4β) Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.....	14
5)ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	17
Α. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.....	17
Β. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου.....	17
Γ.Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.....	18
6)ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
7)ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	21.
<u>B' ΜΕΡΟΣ</u>	22-50
1) ΥΛΙΚΑ.....	22
1α. Χημικά αντιδραστήρια.....	22
1β.Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος.....	22
2) ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2α. Μέθοδος ΧΤΤ.....	23
2β. Μεθοδολογία.....	23
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3α. Διάγραμμα συσχέτισης τιμών IC 50 και TPC.....	26
3β. Πίνακας συσχέτισης ανάμεσα στις τιμές IC 50 και τις συγκεντρώσεις πολυφαινολικών ενώσεων.....	27
3γ. Διαγράμμα για κάθε εκχύλισμα της % Αναστολής σε σχέση με τα µg/ml του κάθε εκχυλίσματος.....	28-42
3δ. Πίνακας εκχυλισμάτων.....	43
Συνολικό διάγραμμα που περιλαμβάνει όλα τα εκχυλίσματα και τα IC50 τους	
4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47-50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος πιο σημαντικός καρκίνος(μετά τον καρκίνο του μαστού) για την γυναίκα παγκοσμίως. Αν και έγιναν μεγάλα βήματα όσον αφορά την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (με την ανακάλυψη του Pap τεστ) τα ποσοστά θνησιμότητας είναι ακόμη αρκετά υψηλά. Έτσι η επιστήμη αναζητά άλλους τρόπους για την αντιμετώπιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (χημειοπροφύλαξη και νέα αντικαρκινικά φάρμακα). Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα για την επίδραση των εκχυλισμάτων της αμπέλου στα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa). Αν και εξετάστηκαν εκχυλίσματα αμπέλου από γίγαρτα και στέμφυλα δεν έχουν μελετηθεί καθόλου εκχυλίσματα βοστρύχων. Ο σκοπός λοιπόν της εργασίας αυτής είναι να εξεταστεί η δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων αμπέλου έναντι της αύξησης των (HeLa). Η επίδραση των 15 εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν συνολικά (9 βόστρυχοι, 4 γίγαρτα, 2 στέμφυλα) στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας εκτιμήθηκε με την χρήση της μεθόδου XTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχων έχουν χημειοπροστατευτική δράση γιατί μπορούσαν σε μικρές συγκεντρώσεις να αναστείλουν την αύξηση των HeLa, όπως τα γίγαρτα.

ΜΕΡΟΣ Α

1) ΓΕΝΙΚΑ: ΣΤΑΦΥΛΙΑ

Το αμπέλι ξεκίνησε να καλλιεργείται από την εποχή του χαλκού καθώς από ανασκαφές που έγιναν βρέθηκαν κουκούτσια από σταφύλια σε κατοικίες της εποχής αυτής.

Το αμπέλι ανήκει στην οικογένεια Vitaceae το γένος Vitis και το είδος V.Vinifera και κατάγεται από τις περιοχές της Μεσογείου και από τη δυτική Ασία.

Το σταφύλι είναι ο καρπός (το φαγώσιμο μέρος) του αμπελιού. Τα σταφύλια αποτελούν ένα από τα πιο δημοφιλή φρούτα στην διατροφή του ανθρώπου. Πιστεύεται ότι είναι από τις πιο ωφέλιμες τροφές γιατί είναι πλούσια σε βιταμίνες και οργανικά άλατα. Γενικά, τα σταφύλια σε μεγάλες ποσότητες προκαλούν διούρηση και αποβολή τοξινών λόγω της περιεκτικότητας τους σε κάλιο.



Στην Ελλάδα υπάρχουν πολλές ποικιλίες επιτραπέζιες και οινοποιήσιμες με λευκά και μαύρα σταφύλια. Οι κυριότερες ποικιλίες είναι: Ασύρτικο, Μοσχάτο Αμβούργου, Σαββατιανό, Ροδίτης, Ροζακί, σουλτανίνα, , μαυροτράγανο, Βοηδομάτο, Ρομπόλα , Visanto, και άλλες. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο το ενδιαφέρον από τους επιστήμονες για τα σταφύλια, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στους Γάλλους παρατηρείται μειωμένη συχνότητα καρδιοπαθειών αν και η διατροφή τους είναι αυξημένη σε λιπαρά. Η αυξημένη κατανάλωση κρασιού από τους Γάλλους πιστεύεται ότι είναι ένας από τους λόγους στους οποίους οφείλεται αυτό το παράδοξο (Renaud και Lorgeril 1992).



Τις τελευταίες δεκαετίες αν και έχουν προχωρήσει πάρα πολύ οι έρευνες όσον αφορά την χημική σύσταση των σταφυλιών και του κρασιού παρόλο αυτά δεν είναι πλήρως γνωστή . Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί πάνω από 550 χημικές ουσίες και από αυτές 150 είναι εστέρες. Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις είναι το νερό, τα σάκχαρα, αρωματικές ενώσεις και οργανικά οξέα. Η συγκέντρωση του νερού είναι καθοριστική και επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του σταφυλιού. Η φρουκτόζη και η γλυκόζη είναι τα σάκχαρα που συναντώνται περισσότερο και

σπανιότερα η σουκρόζη. Οι συγκεντρώσεις που συνήθως κυμαίνονται οι περισσότερες ενώσεις είναι: 10^{-1} - 10^{-6} mg/lit ενώ υπάρχουν και ορισμένες ενώσεις οι οποίες δίνουν τη γεύση και το άρωμα στα σταφύλια και η συγκέντρωσή τους είναι >100 mg/lit. Η πιο σημαντική όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που βρίσκεται στα σταφύλια και στο κρασί, όσον αφορά την βιολογική δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες. (Jackson 1993) Μελέτες έδειξαν ότι οι φυτικές πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτική δράση σε μικρές συγκεντρώσεις.

Γενικότερα το κρασί ελαττώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνων, όπως γαστρικού καρκίνου, ανώτερου γαστρεντερικού, του πνεύμονα και του εντέρου (Biachini & Vanio H. 2003). Και για την δράση αυτή πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζουν οι πολυφαινόλες του κρασιού καθώς είναι γνωστές οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητές τους, κυρίως λόγω της προστασίας από το οξειδωτικό stress που παρέχουν στο DNA των κυττάρων (Dolara et al., 2005)

Επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι η πολυφαινολική ουσία ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών έχει αντικαρκινική δράση. Είναι μια κατηγορία χημικών ενώσεων που ο ρόλος τους είναι να προστατεύουν τα φυτά από ασθένειες. Τα φυτά όταν δεχθούν επιθέσεις από μύκητες ή άλλα μικρόβια παράγουν την ρεσβερατρόλη για να προστατευθούν. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη μειώνει την συχνότητα του καρκίνου γιατί παρεμβαίνει σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης του καταστέλλοντας την δημιουργία καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι μειώνει τη φλεγμονή, μειώνει τη σύνθεση πρωτεϊνών (NF-kappa B) που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού όταν αυτός δέχεται επίθεση. Η πρωτεΐνη NF-kappa B εμπλέκεται στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και των μεταστάσεων. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται όπως προαναφέρθηκε στα σταφύλια όπως και στα βατόμουρα στα φασόλια, στον ευκάλυπτο στις φράουλες και άλλα. Επίσης το κόκκινο κρασί περιέχει περισσότερες πολυφαινόλες παρά το άσπρο κρασί διότι η παρασκευή του άσπρου κρασιού επιβάλλει την αφαίρεση της φλούδας των σταφυλιών μετά το λιώσιμο.

Μελέτες με αντίστοιχα πειράματα που έχουν γίνει δείχνουν ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες (π.χ. το κόκκινο κρασί) βοηθά στη μείωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων. Μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης τους οι πολυφαινόλες του σταφυλιού βοηθούν στο να επιβραδυνθεί ή να αντιμετωπιστεί η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από την οξειδωση. Οι πολυφαινόλες μειώνουν την οξειδωση της χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Day et al., 1997),

ένα βασικό στάδιο για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Οι πολυφαινόλες έχουν επίσης και άλλες προστατευτικές επιδράσεις στην καρδιά και τα αγγεία, όπως και δράσεις για την μείωση της πηκτικότητας του αίματος και προστασία από ανωμαλίες στον καρδιακό ρυθμό(Chou et al.,2001).

Οι μέχρι τώρα έρευνες και τα αποτελέσματα που έχουν δώσει αυτές αφορούν εργαστηριακά πειράματα που έχουν γίνει σε ζώα. Τα τελευταία όμως χρόνια γίνονται έρευνες σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με εκχυλίσματα σταφυλιών και έδειξαν βελτίωση της ροής του αίματος και μείωσης των επιπέδων της χοληστερόλης. Τέλος αποτελέσματα άλλων πειραμάτων έδειξαν ότι με την κατανάλωση χυμού σταφυλιών, οι ασθενείς με στεφανιαία νόσο είχαν βελτίωση στη ροή του αίματος και μείωση της αρτηριακής τους πίεσης, όταν αυτοί ήταν υπερτασικοί.

2. ΒΟΣΤΡΥΧΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

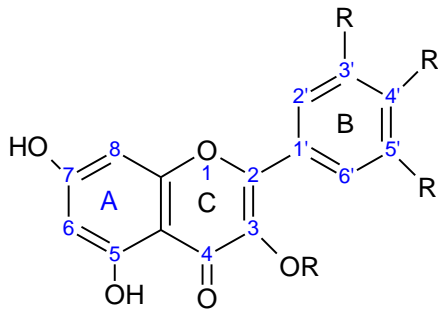
Ο βότρυς, ο καρπός του αμπελιού αποτελείται από τον βόστρυχο (το ξυλώδες μέρος) και τις ράγες. Η αναλογία βόστρυχος-ράγες είναι : 3-7% κατά βάρος κι 30% κατά όγκο (ο βόστρυχος) και 93-97% κατά βάρος και 70% κατά όγκο (οι ράγες), χωρίς όμως αυτή η αναλογία να είναι σταθερή. Αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες π.χ. η ποικιλία, το έδαφος, οι συνθήκες καλλιέργειας, οι τυχόν ασθένειες που έχουν προσβάλλει το αμπέλι και κατά συνέπεια έχουν επηρεάσει τον βότρυ και άλλες. Ο βόστρυχος αποτελείται αρχικά από ξηρή ουσία (10%) και νερό (90%). Η ξηρή ουσία αποτελείται από ξυλώδεις ουσίες και ταννίνες. Στη συνέχεια όμως έχουμε μείωση του νερού (65-75%) και άρα αύξηση της ξηρής ουσίας που οφείλεται στην ξυλοποίηση των ιστών ή ξήρανσή του (Σουφλερός 2000). Μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα από βόστρυχο αμπέλου είναι πλούσια σε φυτικές πολυφαινόλες (Anastasiadi et al., 2009).

3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

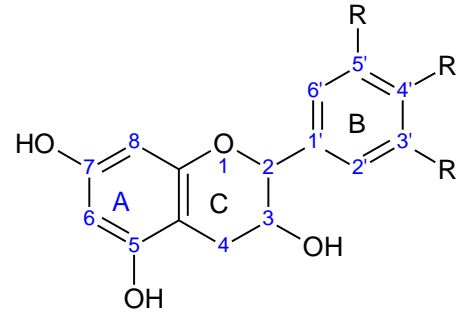
Οι πολυφαινόλες είναι φυτοχημικές ουσίες ωφέλιμες για την υγεία μας. Στις πολυφαινόλες ανήκουν τα φλαβονοειδή στα οποία περιλαμβάνονται οι μονομερείς κατεχίνες και επικατεχίνες και οι πολυμερείς προανθοκυανιδίνες. (Manach et al., 2004) Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων και σήμερα υπολογίζονται σε πάνω από 8000. Βασικό τους χαρακτηριστικό είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες.

Η κύρια πηγή για πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά είναι η διατροφή, μιας και η πολυφαινόλες βρίσκονται σε ποικιλίες τροφίμων που περιέχουν φυτοχημικά συστατικά. Τα περισσότερα όσπρια, φρούτα (σταφύλια, μήλα, μούρα, κεράσια, αχλάδια, δαμάσκηνα φράουλες και άλλα) και λαχανικά (μπρόκολο, λάχανο, σέλινο, κρεμμύδι και μαϊντανός) είναι πλούσια σε πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά. Το κόκκινο κρασί, η σοκολάτα, το πράσινο τσάι, το ελαιόλαδο, η γύρη της μέλισσας είναι εναλλακτικές πηγές. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε 100 γρ. κόκκινου κρασιού περιέχονται 340 mg φαινόλες και 163 mg φλαβονοειδή (Lee et al., 2003)

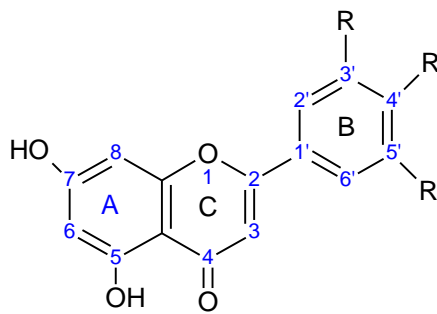
Φλαβονόλες



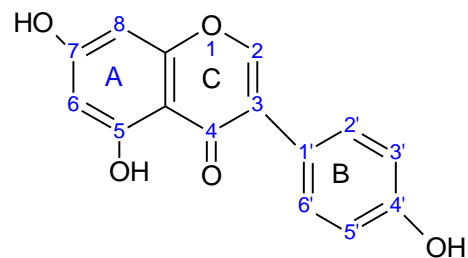
Φλαβανόλες



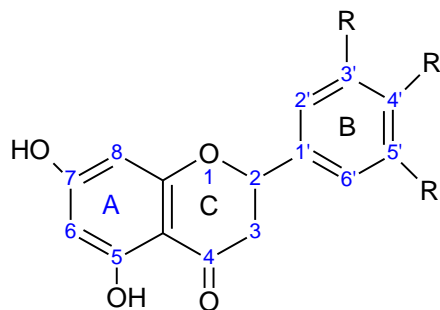
Φλαβόνες



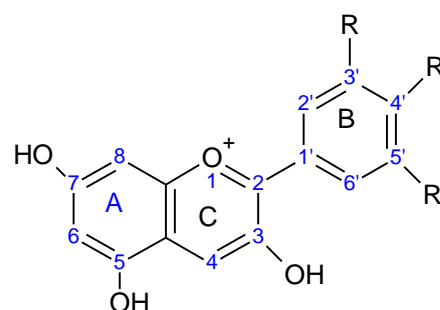
Ισοφλαβόνες



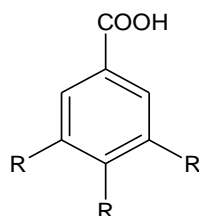
Φλαβανόνες



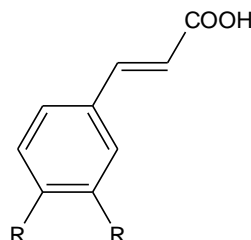
Ανθοκυανιδίνες



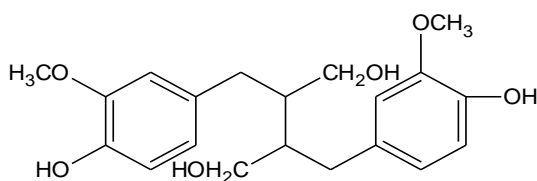
Εικόνα: Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.



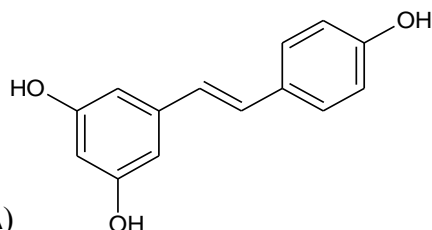
(A)



(B)



(Γ)



(Δ)

Εικόνα: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (A) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (B) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοΐσολαρισιρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων χρωστικών που βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα φυτά και αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της αντικαρκινικής, αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιβακτηριακής, αντιαλλεργικής και αντιϊικής. (Duarte J. 1993 – Pietta P-G 2000) Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών που περιλαμβάνει περισσότερες από 4500 ενώσεις και χωρίζεται σε 13

υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Ανάλογα του βαθμού οξείδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου διαιρούνται σε κατηγορίες: α) τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη, μαλβιδίνη) οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρωση β) τις φλαβόνες (απιγενίνη, λουτεολίνη), φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικετίνη, ισοραμνετίνη), ισοφλαβόνες (πομπερίνη, νταλπανίνη, γενιστεΐνη) οι οποίες έχουν έντονο αντιμικροβιακή δράση γ) φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη). Τα φλαβονοειδή μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Σημαντική κατηγορία πολυμερών είναι οι προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες που προκύπτουν από πολυμερισμό των φλαβανολών με τους γαλλικούς εστέρες τους με δεσμούς μεταξύ του C4 και του C6 ή C8. Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cook και Samman 1996). Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο ενώ μέχρι τώρα δεν έχουν βρεθεί σε ζώα.

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

Εκτός από τα φλαβονοειδή στις πολυφαινόλες επίσης ανήκουν τα πολυφαινολικά οξέα τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος και του υδροξυκιναμικού. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford

και Scalbert 2000). Στα φυτά βρίσκονται περισσότερο τα υδροξυκινναμικά οξέα (όπως το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό, το κουμαρικό και τα σιναπικά οξέα). Σε πολλά φρούτα όπως και στον καφέ συναντάτε το χλωρογενικό οξύ που σχηματίζεται από το καφεϊκό οξύ και από το κουινικό οξύ (Clifford 1999). Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών τα οποία είναι η βασική πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο. Το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ είναι το καφεϊκό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα φυτά (Lempereur et al., 1997). Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κατά κύριο λόγο στα χυμοτόπια των κυττάρων.

4. ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

4 α. Γενικά

Ο Ιπποκράτης (πατέρας της ιατρικής) ήταν αυτός που έδωσε στην πάθηση του καρκίνου το όνομα. Παρομοίασε τους όγκους με την εικόνα του κάβουρα (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 σημαντικότερες αιτίες θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες μετά από τις καρδιοπάθειες. Προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας αλλά και άτομα νεαρής ηλικίας, ακόμη και παιδιά.

Ο καρκίνος είναι η ανώμαλη ανάπτυξη κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων σε διάφορα σημεία του σώματος. Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια η οποία μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος. Ο όρος αναφέρεται σε περίπου 150-200 διαφορετικές παθήσεις, ωστόσο έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά στοιχεία: την απεριόριστη αύξηση των κυττάρων και τις δυσλειτουργίες τις οποίες προξενεί αυτή. Είναι μια ομάδα νοσημάτων που η αιτία τους βρίσκεται σε κυτταρικό επίπεδο. Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά (αναπαράγονται και πολλαπλασιάζονται με ελεγχόμενο τρόπο) διότι συνεχίζουν και διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων που ονομάζεται όγκος. 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 όργανα του

σώματος. Γενικά δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη. Τα ανώμαλα κύτταρα του καρκίνου πολλαπλασιαζόμενα δημιουργούνε τους κακοήθεις όγκους. Διηθούν, εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς και όργανα και τα καταστρέφουν δηλ. αποσπώνται από τον πρωτογενή όγκο και μεταφέρονται σε άλλα μέρη του σώματος. Δημιουργούνε νέες αποικίες που αποκαλούνται μεταστάσεις ή δευτερογενείς καρκίνοι. Οι νέες αυτές αποικίες του καρκίνου συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο όπως ο πρωτογενής όγκος. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες. Το μέγεθος του όγκου, η θέση του στο σώμα και το στάδιο ανάπτυξής του είναι οι παράγοντες που καθορίζουν τα προβλήματα υγείας στον άνθρωπο. Κάθε καρκίνος (π.χ. καρκίνος της μήτρας, του πνεύμονα, του μαστού κτλ.) έχει διαφορετικά συμπτώματα, διαφορετική εξέλιξη και άρα είναι διαφορετική ασθένεια και αντιμετωπίζεται διαφορετικά.

4 β. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (HeLa)

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι η δεύτερη περισσότερο διαδεδομένη μορφή καρκίνου των γυναικών, μετά από τον καρκίνο του μαστού. Επίσης είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος των γυναικείων γενετικών οργάνων μετά από τον καρκίνο της ωοθήκης. Στις δυτικές χώρες 2 στις 100 γυναίκες θα προσβληθούν από καρκίνο του τραχήλου της μήτρας πριν από το 80^ο έτος της ηλικίας τους. Η μέση ηλικία προσβολής από διηθητικό καρκίνο του τραχήλου της μήτρας είναι τα 45 χρόνια. Δεν αποκλείεται όμως η εμφάνισή του και σε νεότερες ηλικίες ακόμη και σε περίοδο εγκυμοσύνης. Στην Ευρώπη 33.500 γυναίκες προσβάλλονται ετησίως και 15.000 από αυτές πεθαίνουν. Αυτό είναι απαράδεκτο γιατί ο καρκίνος αυτός εντοπίζεται σε ένα όργανο σχετικά εύκολα προσπελάσιμο (ο τράχηλος της μήτρας βρίσκεται στο βάθος του κόλπου) και φαίνεται πως παραμένει σε ένα προκαρκινικό ασυμπτωματικό στάδιο για αρκετά χρόνια. Μια διάγνωση σε αυτό το στάδιο μπορεί να θεραπεύσει τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σε ποσοστά σχεδόν 100%. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας προκαλείται από έναν ιό (των ανθρώπινων θηλωμάτων) τον γνωστό ως HPV που μπορεί να περάσει από άτομο σε άτομο με την σεξουαλική επαφή.

Αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουν οι γυναίκες οι οποίες;

1) έχουν αυξημένη σεξουαλική δραστηριότητα - είτε άρχισαν τις σχέσεις σε μικρή ηλικία, είτε έχουν πολλούς συντρόφους,

2) έχουν προσβληθεί από ορισμένες νόσους, όπως η μόλυνση από τον ιό του έρπητα τύπου II,

3) βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή μετά από μεταμόσχευση οργάνου,

4) τέλος, γυναίκες των οποίων η μητέρα πήρε το φάρμακο διαιθυλοστιλβεστρόλη (DES) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.(Κ. Παπαβασιλείου 1991)

Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας έχουμε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων του τραχήλου, αλλά ο καρκίνος αναπτύσσεται αργά. Τα στάδια του καρκίνου του τραχήλου είναι 5:

0 Ενδοεπιθηλιακός καρκίνος ή in situ δηλ. μη διηθητικός καρκίνος.

1 Αρχόμενος καρκίνος

2 Προχωρημένος καρκίνος

3 Κατάσταση βαριά

4 Κατάσταση μη αναστρέψιμη με μεταστάσεις (Κ. Παπαβασιλείου 1991)

Η κυτταρική σειρά HeLa είναι μια σειρά κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που πήραν το όνομά τους από τα αρχικά του ονόματος (Henrietta Lacks) της πρώτης ασθενούς που είχε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας στις αρχές του 1950. Τα HeLa είναι από τα πιο επαναστατικά εργαλεία στην Βιοϊατρική έρευνα και έχει παίξει πολύ μεγάλο ρόλο στις πιο σημαντικές ιατρικές εξελίξεις. Η σημασία αυτών των κυττάρων έγκειται στην αθανασία τους .Την ικανότητα τους να ζουν και να αναπαράγονται επ' άπειρον. Τα κύτταρα ανήκαν σε μια φτωχή καπνεργάτρια του Αμερικάνικου νότου Αφρικάνικης καταγωγής. Η Henrietta Lacks έπασχε από μια μορφή καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και πέθανε το 1951 σε ηλικία μόλις 31 ετών και ο γιατρός της

κράτησε δείγμα των καρκινικών κυττάρων τα οποία καλλιέργησαν επιστήμονες στο εργαστήριο. Αυτή ήταν η πρώτη φορά που μια σειρά κύτταρα επιζούσαν εκτός ανθρώπινου σώματος. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε πολλούς ερευνητικούς τομείς και από τότε που έφυγε από τη ζωή έχουν παραχθεί εκατομμύρια κύτταρα με βάση τα δικά της κύτταρα ενώ η χρήση τους έχει αναγνωριστεί σε περισσότερες από 60.000 επιστημονικές έρευνες.

Ο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας ήταν κάποτε μια πολύ κοινή ασθένεια στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη. Με την εισαγωγή του Pap τεστ (μια ανακάλυψη του Έλληνα γιατρού Γ. Παπανικολάου), ένα εργαλείο προληπτικού ελέγχου το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων και προκαρκινικών αλλαγών στον τράχηλο, τα ποσοστά του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις ΗΠΑ και άλλα αναπτυσσόμενα κράτη έχουν μειωθεί περίπου κατά 70%. Παρόλο αυτά στα αναπτυσσόμενα κράτη τα οποία δεν έχουν προγράμματα πρόληψης ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί ακόμα μια πολύ σοβαρή ασθένεια. Το 2007 ήταν μια ιδιαίτερη χρονιά για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας καθώς δόθηκε στην διάθεση της επιστήμης το εμβόλιο που πλέον θα προλαμβάνει τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και μπορεί να χορηγηθεί σε κοπέλες ηλικίας 9-26 ετών. Το εμβόλιο ονομάζεται Gardasil και προστατεύει τις γυναίκες από το 75% των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων.

Η θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εξαρτάται από το στάδιο της νόσου. Αν ο καρκίνος είναι περιορισμένος στο επιθήλιο του τραχήλου, τότε ο ιστός που περιέχει τα παθολογικά κύτταρα μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά ή να καταστραφεί χρησιμοποιώντας κρυοπηξία ή τεχνολογία με laser. Πιο διηθητικός καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να απαιτήσει εγχείρηση για την αφαίρεση του προσβεβλημένου ιστού και των οργάνων, και επακολουθεί ακτινοθεραπεία για την καταστροφή των όποιων εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων. Βιολογικές θεραπείες, όπως είναι η ιντερφερόνη, είναι κάποιες φορές ωφέλιμες και, αν ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση, μπορεί να είναι απαραίτητη η χημειοθεραπεία.

5. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Χημειοπροφύλαξη είναι η πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου, η αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας. Θεωρείται από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου και γίνεται μέσω της χορήγησης χημικών ουσιών ή μέσω φυσικών συστατικών με συμπληρώματα διατροφής (Sporn 1976). Σύμφωνα με μελέτες το 80% των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, κάπνισμα και διατροφή (Morse και Stoner 1993). Σύμφωνα με τον Wattenberg (1985) οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες:

A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.

B. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας.

Γ. Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική (progression) φάση της καρκινογένεσης.

A. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου είναι ουσίες οι οποίες αναστέλλουν το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Τέτοιες ουσίες είναι: τα αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), οι φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ), διάφορα αμινοξέα (π.χ. προλίνη) και σουλφυδρυλικές ενώσεις. Για παράδειγμα, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981; Hartman και Shankel 1990; Κουρέτας 2003).

B. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου διακρίνονται σε 4 κατηγορίες:

1) Αναστολείς του κυτοχρώματος P-450. Στην φάση I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών τα ένζυμα παίζουν το σημαντικότερο ρόλο και μπορεί να μετατρέπουν προκαρκινογόνες ουσίες σε καρκινογόνες. Το σημαντικότερο μέλος των ενζύμων είναι το P-450. Έτσι ουσίες οι οποίες μπορούν να αναστείλουν την δράση των ενζύμων του P-450 θεωρείται ότι μπορούν να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση. Τέτοιες ουσίες λοιπόν που αναστέλλουν την δράση του P-450 είναι το ισοθιακυανικό φαινυλεξύλιο και βρέθηκε ότι εμποδίζει την ανάπτυξη όγκων. (Morse et al., 1991)

2) Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών: Ουσίες όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) επάγουν τα ένζυμα της φάσης II και δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

3) Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών. Οι ηλεκτρονιόφιλες ουσίες αντιδρούν με το DNA και σχηματίζουν ενώσεις οι οποίες οδηγούν σε βλάβη του DNA (μεταλλάξεις). Άρα η εξουδετέρωση των ηλεκτρονιόφιλων καρκινογόνων ουσιών είναι βασικός μηχανισμός χημειοπροφύλαξης. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης

4) Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (Κουρέτας 2003) Είναι ουσίες ή ένζυμα οι οποίες αυξάνουν την ικανότητα αποκατάστασης των βλαβών του DNA.

Γ) Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Οι παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης σύμφωνα με τους Morse και Stoner διακρίνονται σε:

1) Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών. Έχει βρεθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της συγκέντρωσης των πολυαμινών και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επίσης βρέθηκε ότι οι πολυαμίνες είναι συχνά αυξημένες στους καρκινικούς ιστούς. Ορισμένοι παράγοντες φαίνεται να δρουν ως αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών.

2) Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης. Τα καρκινικά κύτταρα δεν διαφοροποιούνται. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες (π.χ. βιταμίνη Α) βοηθούν στην αποκατάσταση της διαφοροποίησης συνεπώς έχουμε αναστολή της καρκινογένεσης. (Huang et al., 1986; Sani et al., 2009)

3) Ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελούν στόχους χημειοπροφύλαξης με αποτέλεσμα την φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού

πολλαπλασιασμού (π.χ. φλαβονοειδή καταστέλλουν την καρκινογένεση γιατί αναστέλλουν την δράση της πρωτεϊνικής κινάσης).

4) Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων .Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν άμεσα , έτσι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας αυξητικών παραγόντων ή ορμονών.

5) Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων. Πολλές από τις μελέτες που αφορούν την ικανότητα των χημειοπροστατευτικών ουσιών να αναστέλλουν την δράση των ογκογονιδίων επικεντρώνονται στο ογκογονίδιο ras. Για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη ras πρέπει πρώτα να υποστεί φαρνεσυλίωση. Πειράματα έδειξαν ότι η ουσία D-limonene που βρίσκεται στα κίτρα αναστέλλει την φαρνεσυλίωση κατά συνέπεια αναστέλλει την φάση προόδου των όγκων του μαστού σε αρουραίους που τους δόθηκαν καρκινογόνες ουσίες (Elson et al., 1988).

6)Επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας. Τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω των χασμασυνδέσμων που είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μελέτες έδειξαν ότι στην καρκινογενετική διαδικασία δεν υπάρχει κυτταρική επικοινωνία . Η βιταμίνη A, το β-καροτένιο είναι ουσίες που προάγουν την επικοινωνία των κυττάρων συνεπώς αναστέλλεται η μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά (Zhang et al., 1991: Κουρέτας 2003)

7) Επαγωγείς της απόπτωσης . Η απόπτωση που είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι σημαντικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής αύξησης και του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου οδηγεί σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες επάγουν την απόπτωση π.χ. η ταμοξιφρένη σε κύτταρα του μαστού(Bursch et, al., 1992)

8) Επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω διαφόρων μηχανισμών .Για παράδειγμα η βιταμίνη E αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων (Hill και Grubbs, 1992)

9) Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wainfan και Proirier 1992). Η μεθειονίνη συμμετέχει στη ρύθμιση του ενδοκυττάρου μεταβολισμού του μεθυλίου και αναστέλλει τους όγκους του μαστού σε ποντίκια (Wainfan και Dizik 1987).

10) Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης. Ορισμένα ένζυμα που παράγονται από καρκινικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την λύση της βασικής μεμβράνης με συνέπεια την διήθηση των καρκινικών κυττάρων . Οι πρωτεάσες (π.χ. η κολλαγενάση) είναι οι ενεργοποιητές του πλασμογόνου. Άρα κατά ένα μέρος η χημειοπροστατευτική δράση των πρωτεασών οφείλεται στην αναστολή της βασικής μεμβράνης (Kennedy 1998)

11) Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος . Στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση στην καρκινογένεση παρατηρείται αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λυποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκα οξέα (Κουρέτα 2003). Έτσι έχουμε δημιουργία ελευθέρων ριζών. Μελέτες έχουν δείξει ότι αντιφλεγμονώδη φάρμακα (π.χ. ασπιρίνη και πιροξικάμη) και ορισμένες φυτικές πολυφαινόλες που αναστέλλουν τις κυκλοοξυγενάσες αναστέλλουν και την καρκινογένεση (Huang et al., 1991).

Τα τελευταία χρόνια η χημειοπροφύλαξη αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους για την πρόληψη του καρκίνου και άλλων ασθενειών (Hong και Sporn 1997: Liu 2003)

6.ΣΚΟΠΟΣ

Αν και έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από το φυτό άμπελος, αυτές αφορούν εκχυλίσματα από τον καρπό και κυρίως από τα γίγαρτα ενώ δεν υπάρχουν καθόλου μελέτες για εκχυλίσματα από τους βοστρύχους. Κατά συνέπεια σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστεί η πιθανή ανασταλτική δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) για να διαπιστωθεί αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες.

Πίνακας. Πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων.

STEMS (mg/g extract)	Gallic acid	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Procyanidin B3	Procyanidin B2	Epicatechin gallate	trans-Caftaric acid	trans-Resveratrol	ε-Viniferin	αQ 3-O-galactoside	αQ 3-O-glucoside	αQ 3-O-rhamnoside	Quercetin	Kampferol	Caffeic acid	Syringic acid	p-Coumaric acid	Ferulic acid	Rutin	TPC*	
Κόκκινες ποικιλίες																					
B1	Mayrotragano Santorini 2009	11,48	12,18	19,13	-	-	-	9,09	-	-	-	-	3,94	0,74	0,54	17,44	0,75	3,59	15,93	415	
B1	Mayrotragano Santorini 2007	8,33	66,28	5,21	21,04	3,36	2,68	2,33	4,85	15,82	11,04	5,84	0,63	0,96	0,17	0,05	0,01	0,07	0,00	-	584
B15	Moshato 2009	14,82	9,33	13,32	-	-	-	15,32	-	-	-	-	8,21	0,67	0,58	32,23	0,93	0,51	41,83	407	
B2	Voidomato Santorini 2006	11,49	46,74	11,14	20,54	0,00	5,61	16,11	5,47	12,79	12,06	3,86	0,90	0,80	0,00	0,51	0,14	0,12	0,00	4,47	494
Άσπρες ποικιλίες																					
B5	Asyrtiko Santorini 2006	22,65	75,87	1,27	31,59	2,52	4,12	4,84	6,10	15,54	13,47	4,53	0,32	2,16	0,09	0,00	0,13	0,08	0,00	-	451
B10	Asyrtiko Santorini 2007	1,78	68,85	0,00	30,02	2,48	3,25	2,15	5,13	8,54	9,09	5,15	0,71	0,19	ND	0,01	ND	0,04	0,00	-	574
B8	Asyrtiko Santorini 2008	2,27	98,29	0,00	25,79	8,55	4,46	12,25	11,42	14,53	19,22	7,16	1,53	0,32	0,04	0,00	ND	0,01	0,00	-	372
	Vinsanto 2009	7,32	4,74	4,74	-	-	-	7,78	-	-	-	-	4,63	0,84	0,42	0,80	0,90	2,55	1,92	398	
	Ksinomavro (gigarta)	7,08	13,75	28,31	-	-	-	0,43	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	11,56	0,00	0,52	0,00	383	
	Robola (gigarta)	1,52	2,37	0,00	-	-	-	0,33	-	-	-	-	0,00	0,00	0,24	1,15	0,00	0,28	0,82	356	
	Batiki Tirnavou	4,58	10,87	-	-	-	-	1,20	-	-	-	-	0,35	0,03	0,24	-	-	-	-	-	
B13	Asyrtiko Santorini (Stemfyla)	22,21	47,40	12,50	5,22	21,32	12,21	0,44	0,29	1,41	4,25	4,63	1,90	3,52	0,54	0,23	0,25	0,26	0,09	-	167,0

^aQuercetin. *mgGAE/Kg dm. **ND: Δεν ανιχνεύτηκε.

ΜΕΡΟΣ Β

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1α. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

1β. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

1. Θρεπτικό υλικό για κύτταρα HeLa. Οι πρώτες ύλες για το θρεπτικό υλικό είναι τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

-Θρεπτικό υλικό με 10% FBS

Για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων

200ml DMEM41966
20mlFBS
2ml pen/str
2ml Γλουταμίνη

-Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS

Για την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων

200ml DMEM41966
2ml Γλουταμίνη
2ml pen/str

2. Τρυψίνη

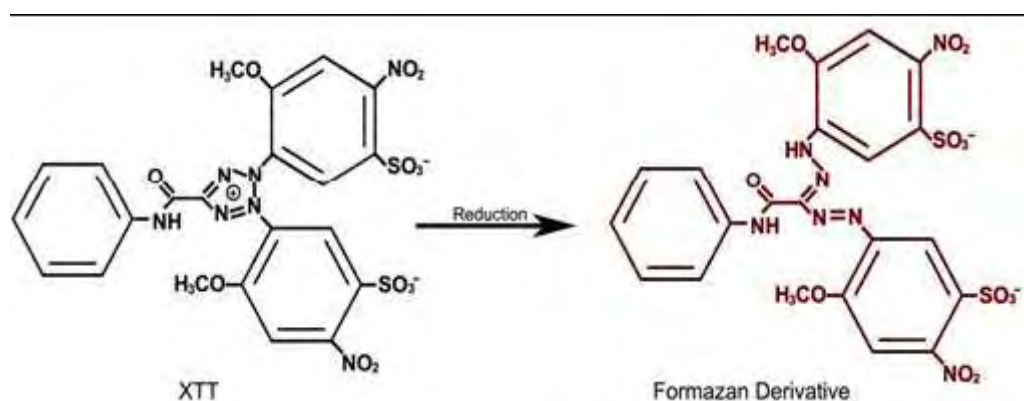
3. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco).

4. Cell Proliferation kit II (XTT) (Roche)

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2a Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HeLa με τη μέθοδο XTT

Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη, ως εκ τούτου, αυτή η μετατροπή εμφανίζεται μόνο σε βιώσιμα κύτταρα.. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση. Η χρωστική ουσία φορμαζάνη που σχηματίζεται λόγω της υδατοδιαλυτότητάς της ποσοτικοποιείται άμεσα με την χρήση ELISA reader. Αυτό εξασφαλίζει ένα υψηλό επίπεδο ευαισθησίας ενώ παράλληλα επιτρέπει τον ταχύ και εύκολο χειρισμό ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση σχηματισμού της φορμαζάνης:



2β. Μεθοδολογία

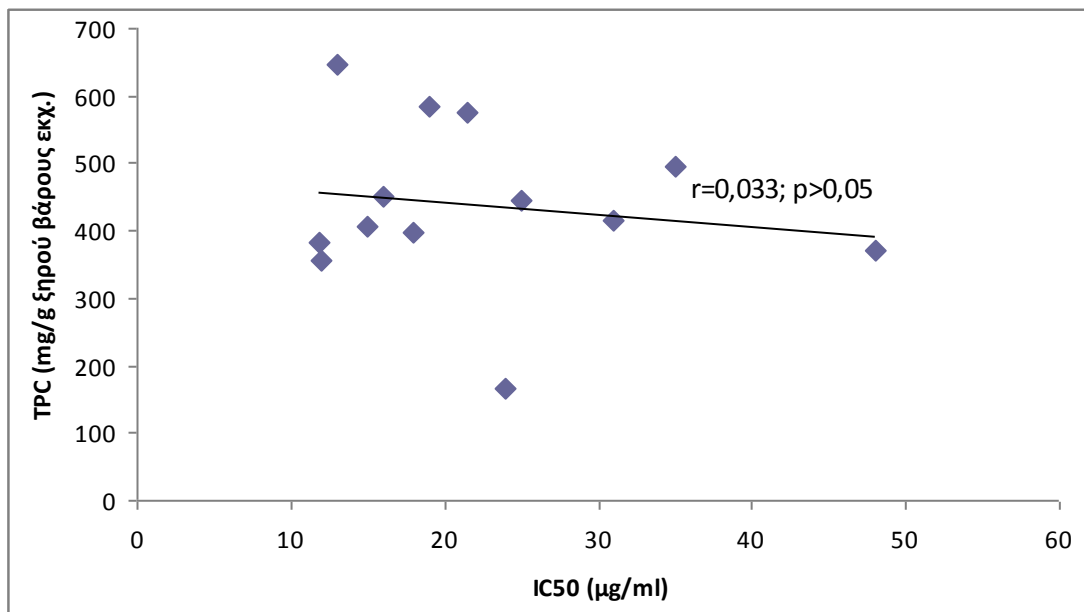
Μετά την αποκόλληση των HeLa κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. Το μίγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν μόνο καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και το XTT/reagent, καθώς και δείγματα μάρτυρες που περιέχουν μόνο τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των ουσιών επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HeLa υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά το πειραματικό μέρος της πτυχιακής μελετήθηκαν 15 εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου. Τα εκχυλίσματα αρχικά ήταν σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS αναλογικά (800 μg εκχυλίσματος/ml θρεπτικό υλικό). Από τα 15 εκχυλίσματα τα 2 ήταν εκχυλίσματα στέμφυλων (Ασσύρτικο Σαντορίνης και Μπατίκι Τιρνάβου), τα 2 ήταν εκχυλίσματα από γίγαρτα (Ξυνόμαυρο και Ρομπόλα) και τα υπόλοιπα 11 ήταν εκχυλίσματα βοστρύχων. Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας HeLa σε συγκεντρώσεις 2.5-80μg/ml. Τα εκχυλίσματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μείωσαν (με την μέθοδο XTT) τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa.

Οι τιμές IC₅₀ (η τιμή κατά την οποία πεθαίνουν το 50% των κυττάρων) όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα (2). Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα αναστολής της αύξησης των κυττάρων από το εκχύλισμα. Οι τιμές των IC₅₀ των εκχυλισμάτων κυμαίνονται από 11,9 μg/ml έως 48 μg/ml. Ισχυρότερη δράση είχε το εκχύλισμα γιγάρτων από το Ξυνόμαυρο με IC₅₀ =11,9μg/ml. Επίσης ισχυρή δράση είχαν τα εξής εκχυλίσματα: Ρομπόλα (γίγαρτα) με IC₅₀ =12μg/ml και Μπατίκι Τιρνάβου (στέμφυλα) με IC₅₀ =13μg/ml. Ακολουθούν εκχυλίσματα βοστρύχων από το Μοσχάτο Αμβούργου 2009, το Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 και το Visanto 2009. Τα ασθενέστερα εκχυλίσματα προέκυψαν από βοστρύχους των ποικιλιών Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008 με IC₅₀ =48μg/ml, Visanto 2006 με IC₅₀=42,5μg/ml και Βοηδομάτο Σαντορίνης με IC₅₀ =35μg/ml. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα 12 από τα 15 που μελετήθηκαν έδωσαν IC₅₀ μεταξύ των τιμών 11,9μg/ml και 31μg/ml. Επίσης τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του IC₅₀ και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC) όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1. Αντίθετα όσον αφορά την συσχέτιση του IC₅₀ με τις πολυφαινόλες βρέθηκε ότι 2 πολυφαινόλες (συριγγικό και φερουλικό οξύ) συσχετίζονται με την ανασταλτική δράση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων όπως φαίνεται στον πίνακα

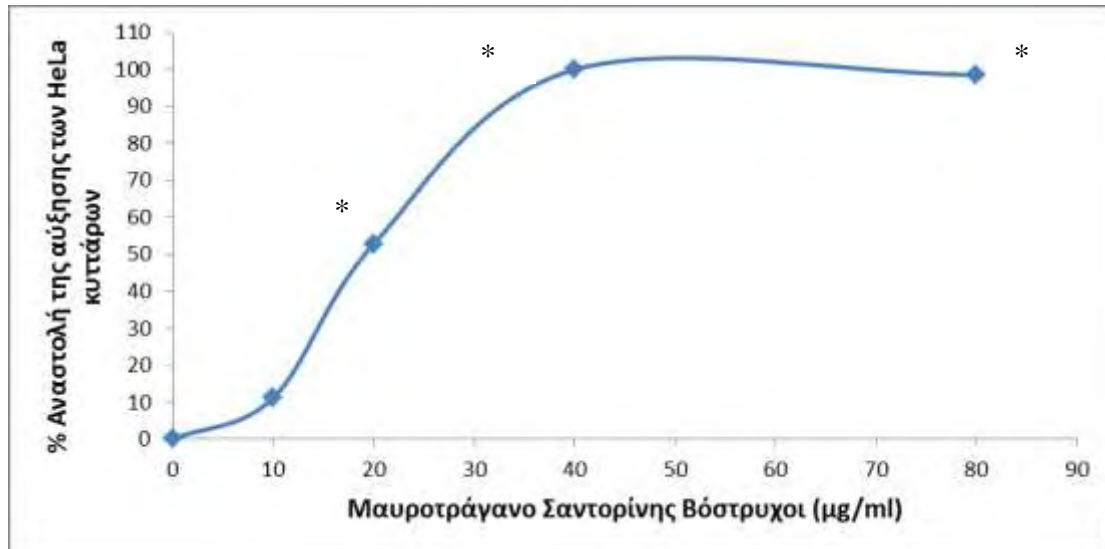


Διάγραμμα 1: Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές IC₅₀ και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC).

	Correlation Coefficient
Hela IC ₅₀	1,000
Gallic acid	0.028
Catechin	0.378
Epicatechin	-0.271
Procyanidin B3	-0.414
Procyanidin B2	0.162
Epicatechin gallate	0.378
trans-Caftaric acid	0.414
trans-Resveratrol	0.161
ε-Viniferin	-0.198
αQ3-O-Galactoside	0.270
αQ3-O-Glucoside	0.270
αQ3-O-Rhamnoside	0.667
Quercetin	-0.014
Kampferol	-0.037
Caffeic acid	-0.100
Syringic acid	-0.717*
p-Coumaric acid	0.042
Ferulic acid	-0.686*
Rutin	0.103

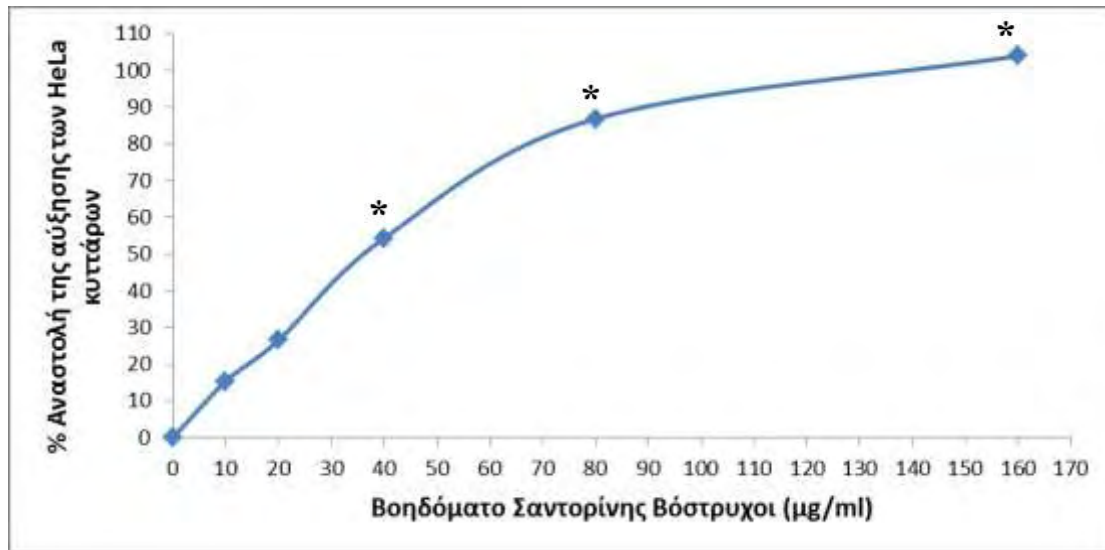
Πίνακας 1: Συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές IC₅₀ και τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα.

Εκχύλισμα βοστρύγου Β1



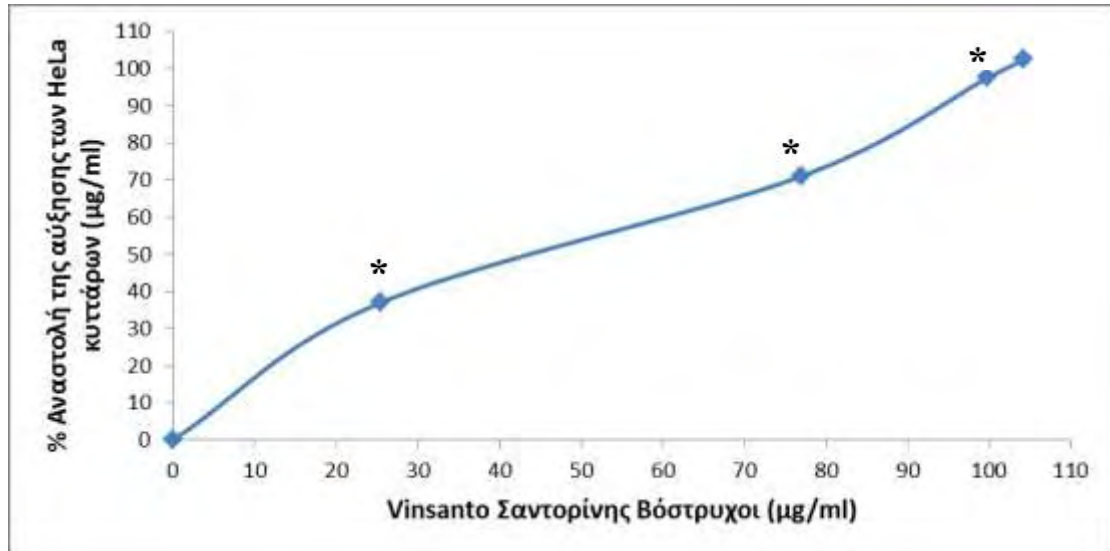
Διάγραμμα 1.1. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου Β2



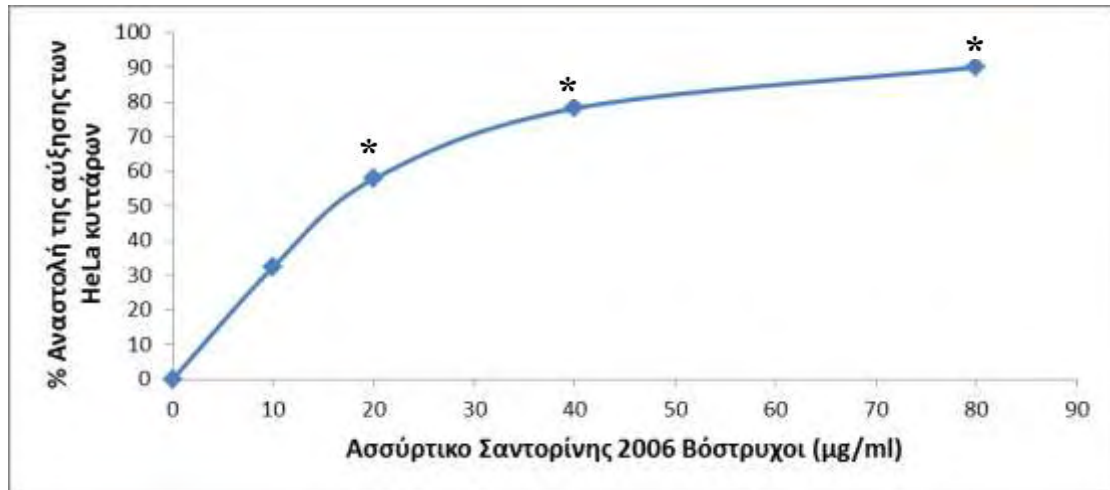
Διάγραμμα 1.2. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Βοηδομάτο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύγου Β4



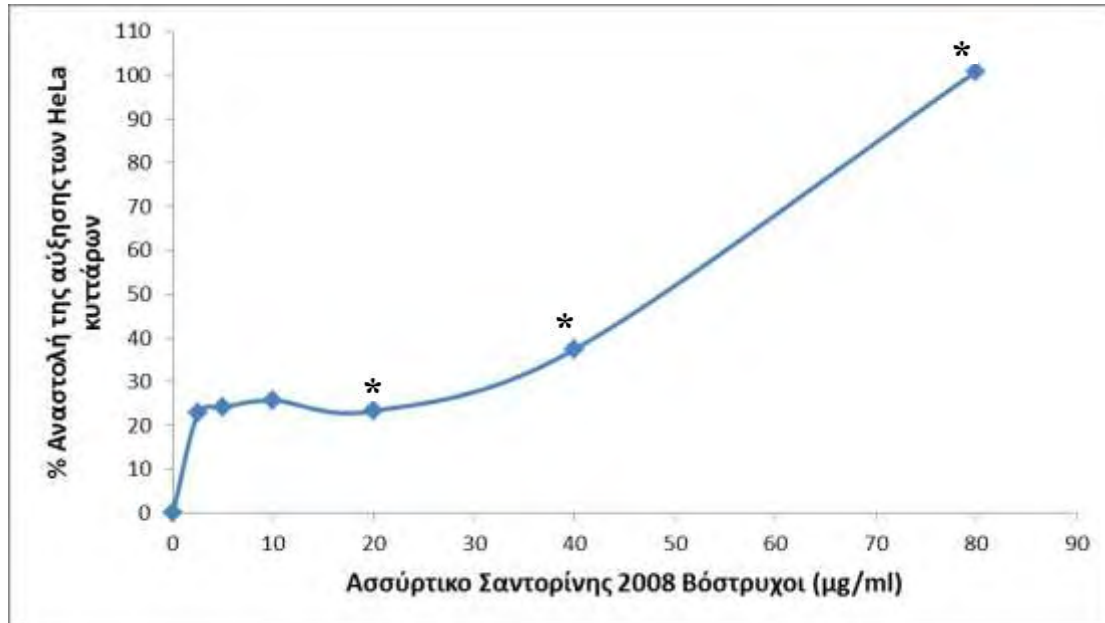
Διάγραμμα 1.3. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύγων Vinsanto Santorini 2006 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου B5



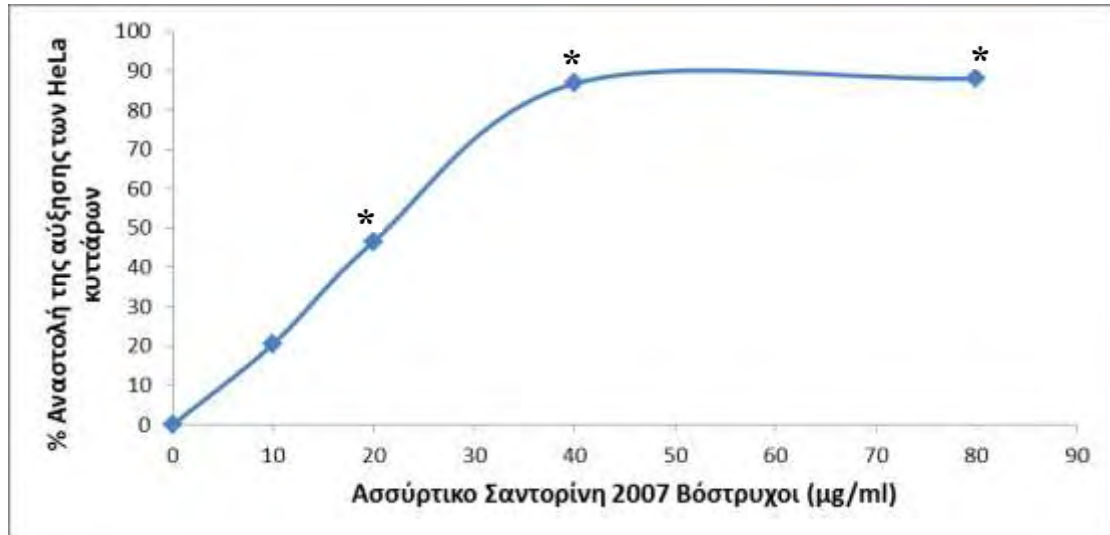
Διάγραμμα 1.4. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύγου Β8



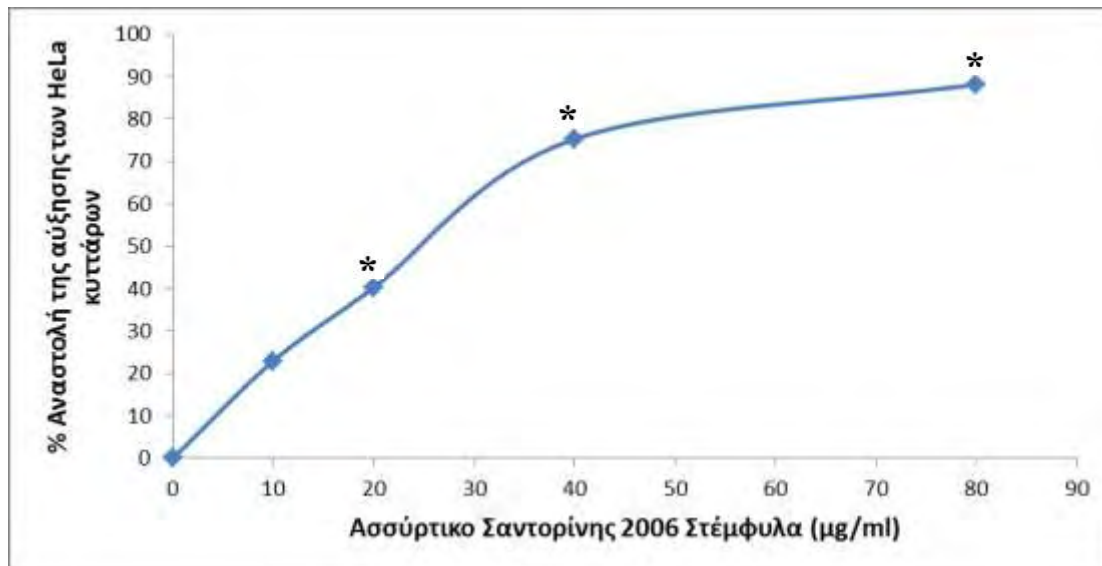
Διάγραμμα 1.5. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου B10



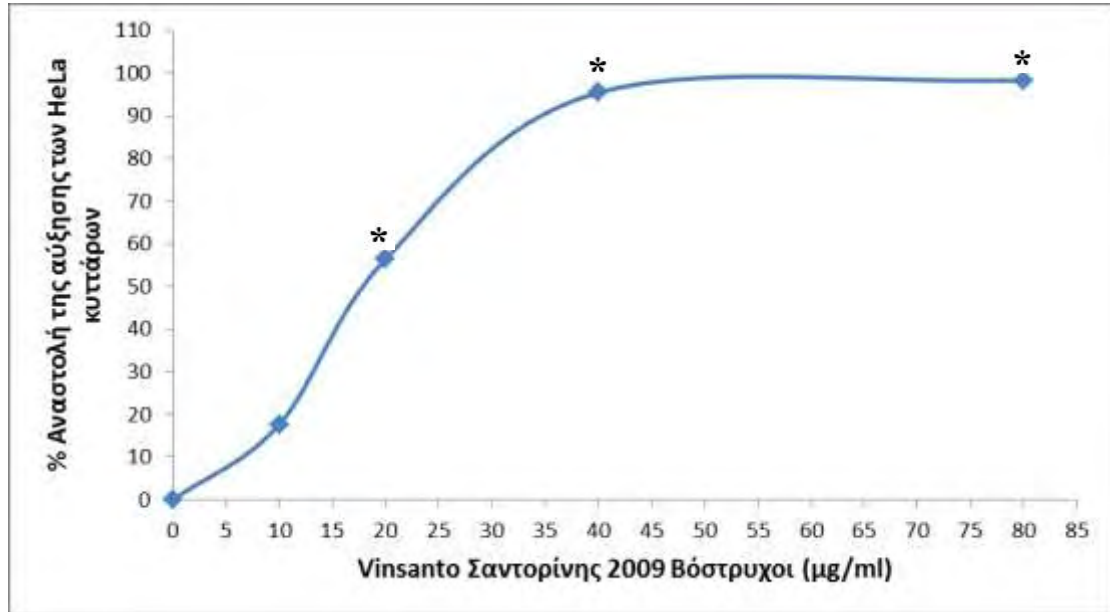
Διάγραμμα 1.6. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Ασσύρτικο Σαντορίνης 2007 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου B13



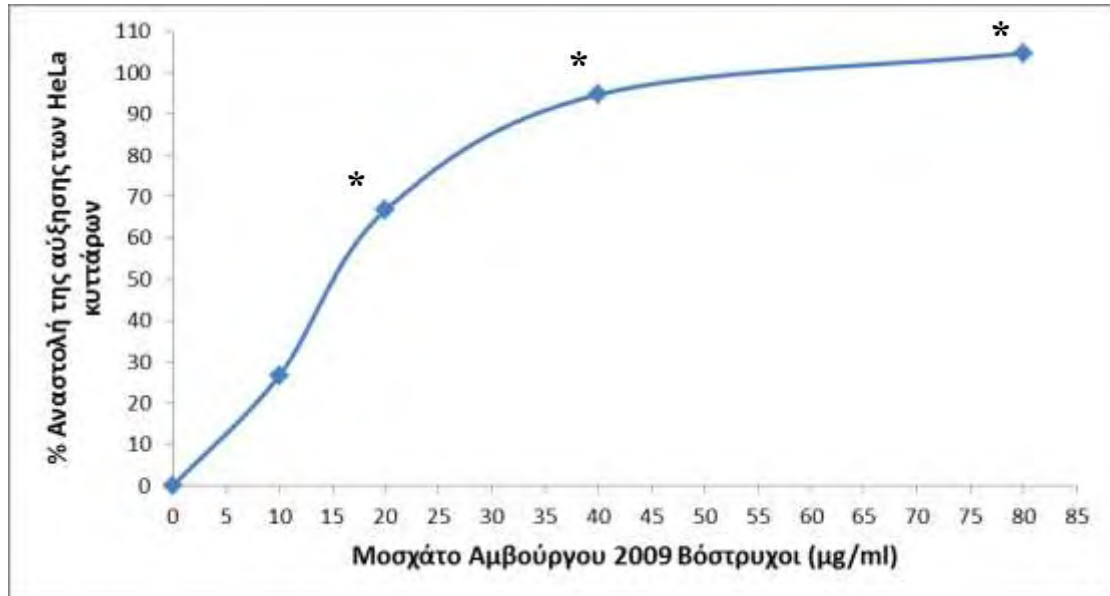
Διάγραμμα 1.7. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στέμφυλων Ασύρτικο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου Visanto



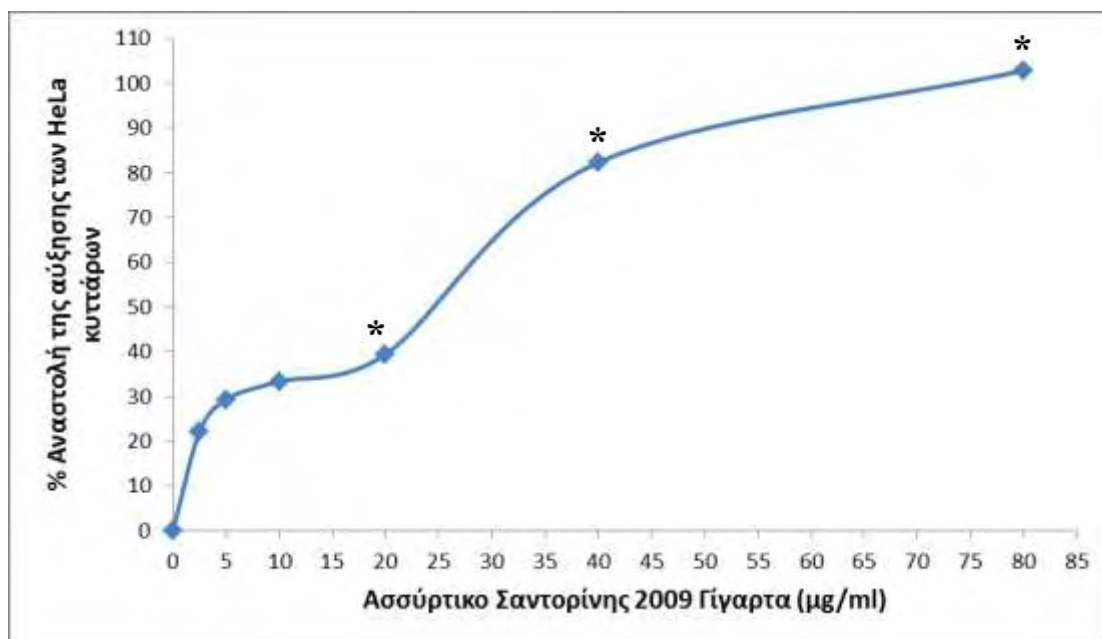
Διάγραμμα 1.8. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Visanto Σαντορίνης 2009 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα βοστρύχου Μοσχάτο Αμβούργου



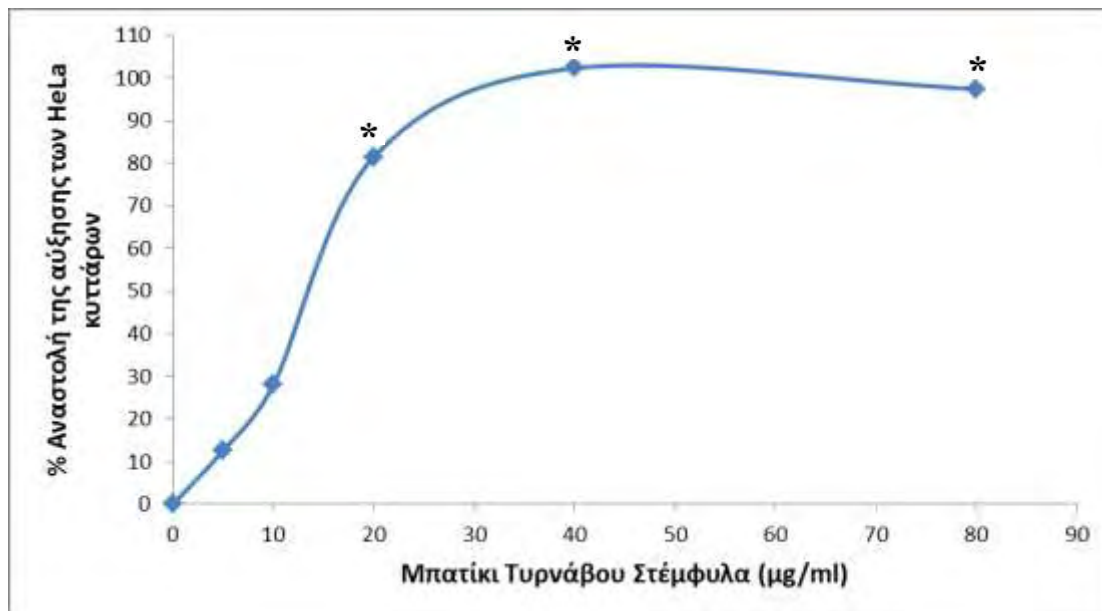
Διάγραμμα 1.9. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μοσχάτο Αμβούργου 2009 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα Ασύρτικο Σαντορίνης



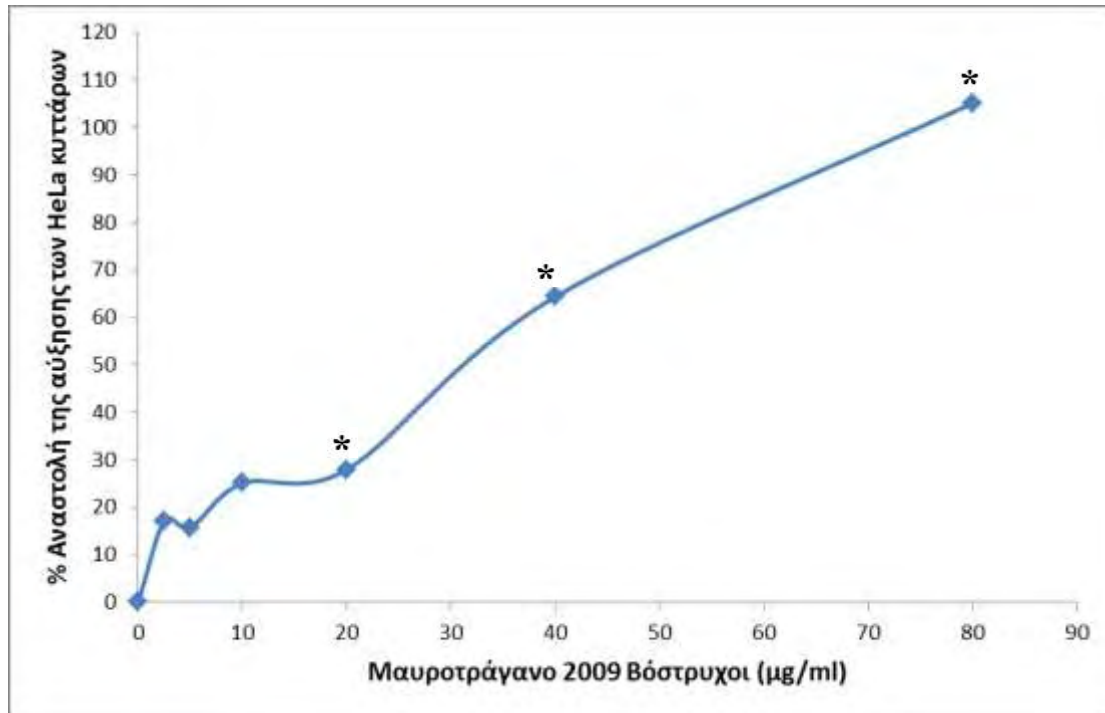
Διάγραμμα 1.10. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος γιγάρτων Ασύρτικο Σαντορίνης 2009 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (Hela) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα Μπατίκι Τυρνάβου



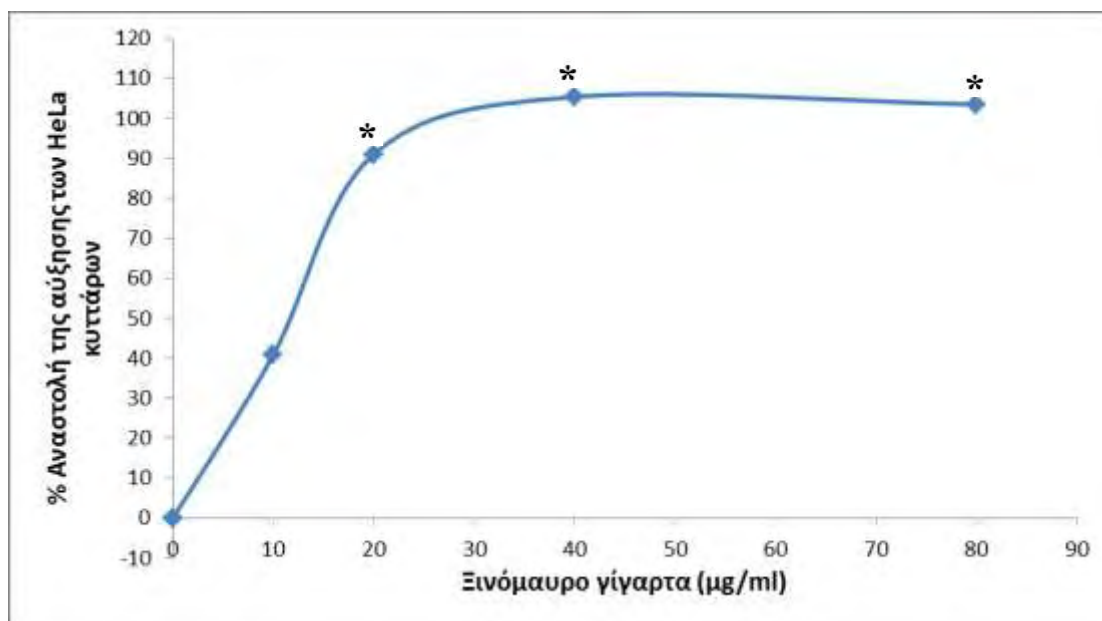
Διάγραμμα 1.11. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στέμφυλων Μπατίκι Τυρνάβου στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα Μαυροτράγανου



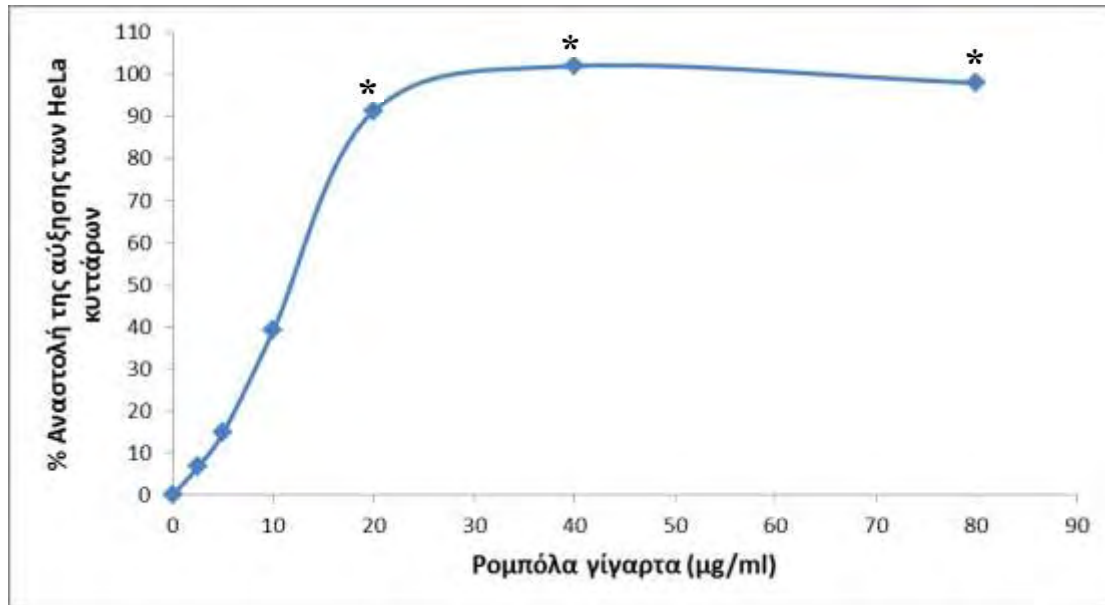
Διάγραμμα 1.12. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μαυροτράγανο 2009 στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα Ξινόμαυρο γίγαρτα



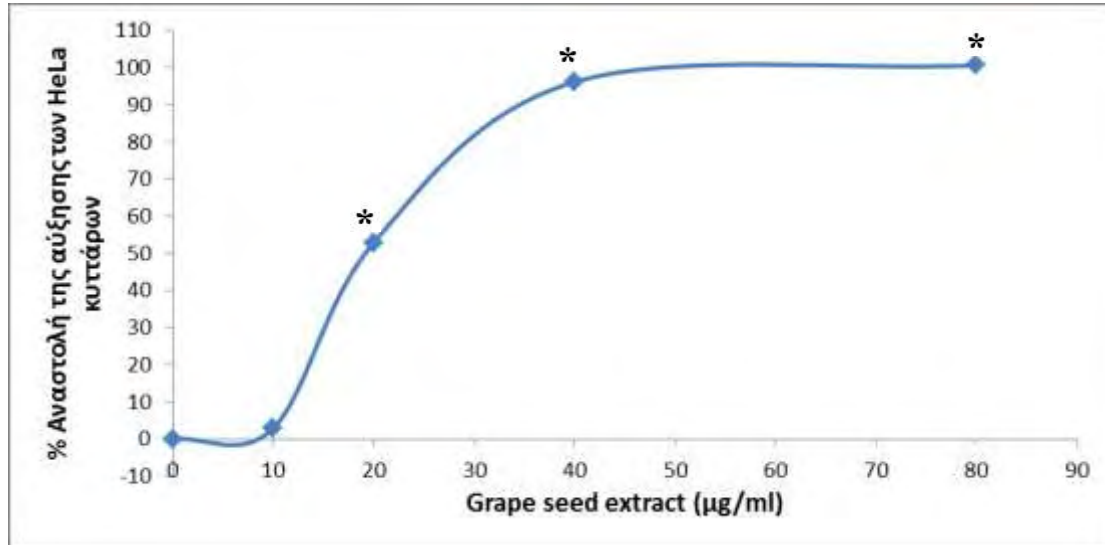
Διάγραμμα 1.13. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος γίγαρτα Ξινόμαυρο στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Εκχύλισμα Ρομπόλα γίγαρτα



Διάγραμμα 1.14. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος γίγαρτα Ρομπόλα στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

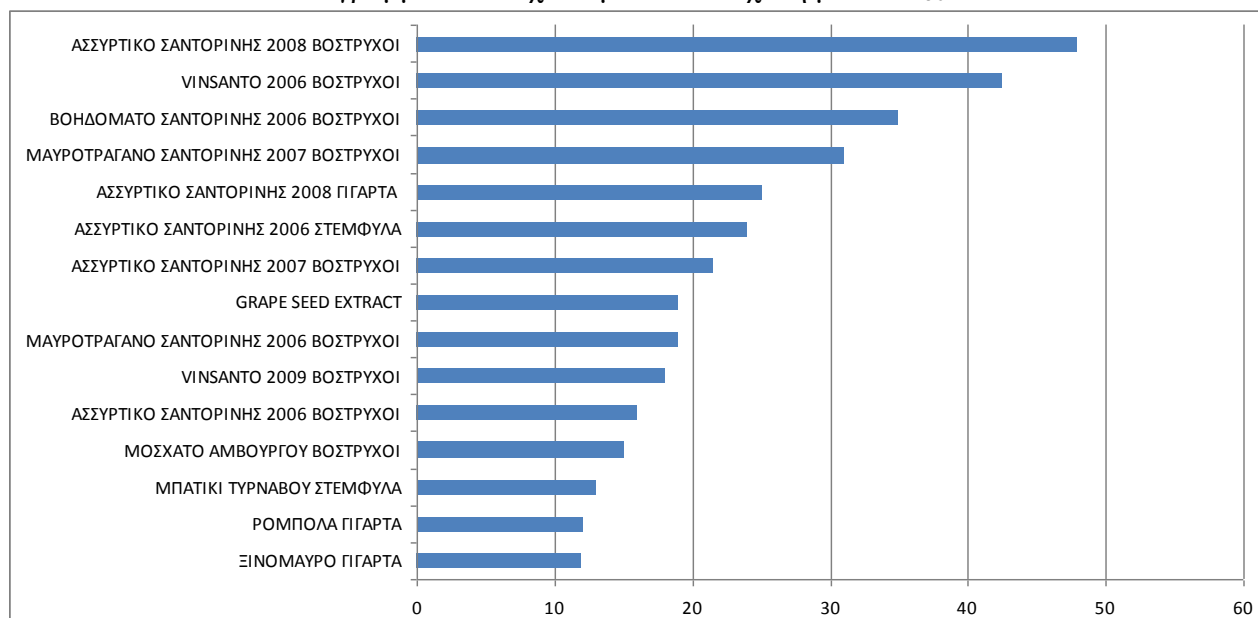
Εκχύλισμα Grape seed extract



Διάγραμμα 1.15. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Grape seed extract στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) . * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειές που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

Πίνακας εκχυλισμάτων

Συνολικό διάγραμμα των εκχυλισμάτων σε σχέση με τα IC₅₀



Διάγραμμα 2: Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου

Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν δείξει ενδιαφέρον και προσοχή για τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες του κρασιού αλλά και των εκχυλισμάτων από άμπελο. Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχονται στον καρπό του αμπελιού και προς αυτή την κατεύθυνση γίνονται πειράματα και έρευνες. Ως συμπληρώματα διατροφής χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα από γιγάρτα που ονομάζονται “Grape seed extract” και θεωρούνται ότι έχουν χημειοπροστατευτικές- αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (Velmurugan et al., 2010, Kaur et al., 2009). Μέχρι τώρα οι περισσότερες μελέτες και έρευνες δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα από βοστρύχους αμπέλου είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (Anastasiadi et al., 2009). Παρόλο αυτά δεν υπάρχουν μελέτες που να αναφέρονται στην αντικαρκινική δράση που μπορεί να έχουν τα εκχυλίσματα βοστρύχων αμπέλου. Με αυτήν την εργασία γίνεται μια προσπάθεια να δούμε τυχόν αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων από βοστρύχους. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν 9 εκχυλίσματα από βοστρύχους από αντίστοιχες ελληνικές ποικιλίες. Επίσης εξετάστηκαν 4 δείγματα από εκχυλίσματα γιγάρτων και 2 δείγματα από στέμφυλα για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Για να εξεταστεί η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε η ανασταλτική τους δράση σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (Hela). Οι λόγοι που προτιμήθηκαν για τα πειράματα τα καρκινικά κύτταρα Hela είναι: α) ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος πιο σημαντικός καρκίνος μετά τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες. β) δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για τα καρκινικά κύτταρα Hela.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα βοστρύχων ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Μάλιστα, σε σύγκριση με μια άλλη μελέτη που έγινε σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG2) (Σπύρου 2010), η μελέτη μας έδειξε ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχων αμπέλου είχαν καλύτερη ανασταλτική δράση στα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας από ότι στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα. Το πιο ισχυρό εκχύλισμα ήταν το εκχύλισμα γιγάρτων της ποικιλίας Ξυνόμαυρο με $IC_{50} = 11,9 \mu\text{g/ml}$ με δεύτερο το εκχύλισμα γιγάρτων της ποικιλίας Ρομπόλα. Το εύρος των τιμών IC_{50} από όλα τα εκχυλίσματα βοστρύχων κυμαινόταν από 15-48 $\mu\text{g/ml}$, με πιο ισχυρό εκχύλισμα

βοστρύχων της ποικιλίας Μοσχάτο Αμβούργου 2009 με $IC_{50} = 15 \mu\text{g/ml}$ και με το Ασύρτικο Σαντορίνης 2006 με $IC_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$ να ακολουθεί. Τα πιο ασθενή ήταν το Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 και το Vinsanto 2006 με IC_{50} 48 και $42,5 \mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Η διαφορετική δράση των εκχυλισμάτων πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική τους χημική σύσταση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι η ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των HeLa κυττάρων τουλάχιστον 5 εκχυλισμάτων βοστρύχων από τα 9 στο σύνολο που μελετήθηκαν (δηλ. το 55%) ήταν παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων από γίγαρτα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ της δράσης εκχυλισμάτων από βοστρύχους και από στέμφυλα. Επίσης η ανασταλτική δράση ανάμεσα στα εκχυλίσματα βοστρύχων άσπρων και ερυθρών ποικιλιών δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές. Αντίθετα παρατηρήθηκε διαφορετική ανασταλτική δράση σε εκχυλίσματα βοστρύχων ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής χρονιάς. Για παράδειγμα το Ασύρτικο Σαντορίνης 2006 είχε τιμή $IC_{50} = 19 \mu\text{g/ml}$ ενώ η ίδια ποικιλία της χρονιάς 2008 είχε τιμή $IC_{50} = 48 \mu\text{g/ml}$ Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην διαφορετική χημική σύσταση λόγω των διαφορετικών κλιματικών συνθηκών.

Όσον αφορά τη δράση των εκχυλισμάτων σε σχέση με τις πολυφαινόλες, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι γενικά δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (TPC), αν και υπήρχαν κάποιες εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα βοστρύχων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης με το μικρότερο TPC είχε και το μεγαλύτερο $IC_{50} = 48 \mu\text{g/ml}$ (δηλαδή την μικρότερη ανασταλτική δράση), ενώ το εκχύλισμα βοστρύχων της ποικιλίας Visanto 2009 με μικρή τιμή TPC είχε από τα μικρότερα $IC_{50} = 18 \mu\text{g/ml}$ (δηλαδή είχε πολύ μεγάλη ανασταλτική δράση). Η απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων και το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο μπορεί να οφείλεται: 1ο) στο γεγονός ότι πιθανώς υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντικαρκινική δράση, 2ο) η αντικαρκινική δράση μπορεί να οφείλεται σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες και 3ο) μπορεί να υπάρχει μια συνεργική δράση μεταξύ των πολυφαινολών ή μεταξύ πολυφαινιλών και άλλων βιοδραστικών συστατικών. Άρα παίζει σημαντικό ρόλο η πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των τιμών IC_{50} και των συγκεντρώσεων των πολυφαινολικών ενώσεων έδειξαν ότι 2 από αυτές, το συριγγικό οξύ και το

φερουλικό οξύ, πιθανώς να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (Hela). Είναι χαρακτηριστικό ότι σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι πολυφαινολικά οξέα συμπεριλαμβανομένων του συριγγικού και του φερουλικού μπορούσαν να αναστείλουν την αύξηση καρκινικών κυττάρων του μαστού. (Kampa M. et. al., 2004)

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν για πρώτη φορά ότι τα εκχυλίσματα (βόστρυχων, γιγάρτων, στέμφυλων) διαφόρων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (Hela). Άρα τα εκχυλίσματα τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Οι βόστρυχοι αποτελούν το 2-7% του συνολικού βάρους του σταφυλιού, τα γίγαρτα το 3-6%, η φλούδα το 6-9% και η σάρκα 75-85%. Χαρακτηριστικό είναι ότι από 100Kg σταφύλια προς οινοποίηση τα νωπά στέμφυλα είναι περίπου 27%. Στην Ελλάδα την πενταετία 1996-2000 παρήχθησαν περίπου 142.000 tn στέμφυλα (η νωπή πούλπα, τα γίγαρτα και οι βόστρυχοι). Από τους 142.000 tn υπολογίζεται ότι οι 28.000 tn είναι βόστρυχοι. Από όλα αυτά τα υποπροϊόντα χρησιμοποιείται μόνο ένα μικρό ποσοστό για ζωοτροφές και παραγωγή τσίπουρου. Ενώ τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες βιομηχανικής επεξεργασίας τους για να παραχθούν μαγειρικά έλαια και άλευρα χωρίς γλουτένη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εκχυλίσματα βόστρυχων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής ή για την παρασκευή βιολειτουργικών τροφίμων με χημειοπροστατευτική δράση. Τέλος επειδή όχι μόνο δεν χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα οι βόστρυχοι αλλά τις περισσότερες φορές προκαλούν και περιβαλλοντολογικά προβλήματα στο περιβάλλον μετά την απόρριψή τους, θα μπορούσε με την κατάλληλη επεξεργασία να αποτελέσουν νέο οικονομικό πόρο υπακούοντας ταυτόχρονα στους κανόνες περιβαλλοντικής προστασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Chemoprevention of liver cancer by phytochemicals Dimitrios Stagos, Dimitrios Kouretas
Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
Ντόζη-Βασιλειάδου Ι, Μουρελάτος Δ. Κυτταρογενετικές μέθοδοι για τη βελτίωση και καθοδήγηση της χημειοθεραπείας. Σε: Εξελίξεις και προοπτικές στην έρευνα βελτίωσης της χημειοθεραπείας του καρκίνου. University Studio Press: Θεσσαλονίκη, 1989.
Τοσσίδης Ι. Γενική και Ανόργανη Χημεία. Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, 1990.
Τριανταφυλλίδης Κ. Κλασική και Μοριακή Γενετική. Εκδόσεις Κυριακίδη: Θεσσαλονίκη, 1992.
Κ..Παπαβασιλείου, Ι. Κουβαρης , Κ. Γεννατάς, Δ. Βώρος(Συντ. Επ.) Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος
Kampa M., Alexaki VI ,Notas G , Nifli AP , Nistikaki A , Hatzoglou A , Bakogeorgou E , Kouimtzoğlu E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. Antiproliferative and apoptic effects of selective phenolic acidw on T47D human breast cancer ceels: potential mechanisms of action. 2004; 6(2):R 63-74.
Κοινοφελής μη κερδοσκοπική οργάνωση φίλων του καρκίνου http://www.bestrong.org.gr

Ξένη βιβλιογραφία

Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ, Haroutounian SA. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification by products. <i>J Agric Food Chem.</i> 2009 Jan 28;57(2):457-63.
Asquith TN, Butler LG. Interactions of condensed tannins with selected proteins. <i>Phytochemistry.</i> 1986 25:1591-1593.
Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. <i>Drugs Exp Clin Res.</i> 1998 24:133-138.
Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. <i>Ann N Y Acad Sci.</i> 2002 957:210-229.
Biachini F & Vainio H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? <i>Eur. J. Cancer Prev.,</i> 2003, 12(5), 417-425
Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. <i>Trends Pharmacol Sci.</i> 1992 13:245-251.
Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. <i>J Sci Food Agric.</i> 2000 80:1044-1062.
Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH.. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. <i>Am J Cardiol</i> 2001 5:553-555.
Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. <i>J Food Sci Agric.</i> 2000 80:1118-1125.
Clifford MN. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Food Sci Agric.</i> 2000 80:1063-1072.
Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Sci Food Agric.</i> 1999 79:362-372.

Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. <i>J Mol Med.</i> 2000 78:333-336.
Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. <i>J Nutr Bioch.</i> 1996 7:66-76.
Cui YY, Xie H, Qi KB, He YM, Wang JF. Effects of Pinus massoniana bark extract on cell proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. <i>World J Gastroenterol.</i> 2005 Sep 14;11(34):5277-82.
Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. <i>Ann Nutr Metab.</i> 1997 41: 353-357.
Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. <i>Gastroenterology.</i> 2004 Nov;127(5):1372-80.
De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albini A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. <i>Mutat Res.</i> 2001 480-481:9-22.
De Flora S, Ramel C. Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. <i>Basic Life Sci.</i> 1990 52:461-462
Dolara P., Luceri C., De Filippo C., Femia A.P., Giovannelli L., Gadern G., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A., Red wine polyphenolw influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colon mucosa in F 344 ratw. <i>Mutation Research</i> 2005,591,237-246
Duarte J. Perez-Vizcaino F. Zarzyela A. Tanargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle <i>Eur.J.Pharmacol</i> 239,1-7, 1993.
Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. <i>Carcinogenesis.</i> 1988 9:331-332.
Ferguson LR, Lim IF, Pearson AE, Ralph J, Harris PJ. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. <i>Mutat Res.</i> 2003 542:49-58.
Gary D. Stoner, ¹ Mark A. Morse, ¹ and Gary J. Kelloff ² . Perspectives in Cancer Chemoprevention <i>Environ Health Perspect</i> 105(Suppl 4):945-954 (1997)
Hill DL, Grubbs CJ. Retinoids and cancer prevention. <i>Annu Rev Nutr.</i> 1992 12:161-181.
Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. <i>Science.</i> 1997 278:1073-1077.
Huang FL, Roop DR, De Luca LM. Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea. <i>In Vitro Cell Dev Biol.</i> 1986 22:223.
Huang MT, Ferraro T, Ho CT. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: <i>Food Phytochemicals for Cancer Prevention I.</i> Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT eds. American Chemical Society: Washington, DC, 1994.
Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. <i>Cancer Res.</i> 1991 51:813-819.
Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model. <i>Cancer.</i> 1991 Nov 15;68(10):2150-4.
Jackson RS. Chemical constituents of grapes and wine. In <i>Wine Science: Principles and applications.</i> Taylor SL ed. Academic Press: San Diego, 1993.

Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. <i>Cancer</i> . 1992 70:977s-982s.
Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, Iijima A, Urushihara A, Kiyosawa K, Okuda M, Hino K, Okita K. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. <i>Hepatology</i> . 1998 May;27(5):1394-402.
Kaur M, Agarwal C, Agarwal R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. <i>J Nutr</i> . 2009 Sep;139(9):1806S-12S. Epub 2009 Jul 29.
Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: Chemical induction of cancer modulation and combination of effects. Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, 1997.
Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. <i>Pharmacol Ther</i> . 1998 78:167-209.
Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Attali P. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. <i>Gastroenterology</i> . 1991 101:635-639.
Lang BH, Poon RT, Fan ST, Wong J. Outcomes of patients with hepatocellular carcinoma presenting with variceal bleeding. <i>Am J Gastroenterol</i> . 2004 Nov;99(11):2158-65.
Lea AGH, Bridle P, Timberlake CF, Singleton VL. The procyanidins of white grapes and wines. <i>Am J Enol Vitic</i> . 1979 30:289-300.
Lee, K. <i>Journal of Agricultural and food Chemistry</i> Dec 3, 2003
Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (<i>Triticum durum</i> L.) grain and its milling fractions. <i>J Cereal Sci</i> . 1997 25:103-110.
Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. <i>Am J Clin Nutr</i> . 2003 78:517S-520S.
Manach, A, Scalbert, C, Morand, C, Remesy and L. Jimenez, <i>American Journal of clinical Nutrition</i> Vol 79, No 5, 727-747 May 2004.
Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. <i>Am J Clin Nutr</i> . 2004 79:727-747.
Meric F, Patt YZ, Curley SA, Chase J, Roh MS, Vauthey JN, Ellis LM. Surgery after downstaging of unresectable hepatic tumors with intra-arterial chemotherapy. <i>Ann Surg Oncol</i> . 2000 Aug;7(7):490-5.
Mirvish SS. Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Inhibition of tumor induction and development. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, 1981.
Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi CI, Desai DH, Amin SG, Chung FL. Structure activity relationships for inhibition of 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-dutanone (NKK) lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. <i>Cancer Res</i> . 1991 51:1846-1850.
Moriwaki H. Prevention of liver cancer: basic and clinical aspects <i>Exp Mol Med</i> . 2002 Nov 30;34(5):319-25.
Nepka C, Asproдини E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. <i>Eur J Drug Metab Pharmacokinet</i> . 1999 24: 183-189.

Pietta P-G, Flavonoids as antioxidants, <i>J. Nat. Prod.</i> , 63, 1035-42 2000
Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. <i>Cancer Lett.</i> 2006 Aug 28;240(2):157-69. Epub 2005 Oct 17. Review.
Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. <i>Cancer Res.</i> 1987 47:5340-5346.
Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. <i>Lancet.</i> 1992 Jun 20;339(8808):1523-6
Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin. <i>Arch Biochem Biophys.</i> 1990 283:107-113.
Sayer JM, Yagi H, Wood AW, Conney AH, Jerina DM. Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid. <i>Am Chem Soc.</i> 1982 104:5562-5564.
Shahidi F, Naczki M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.
Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. <i>J Nutr.</i> 2000 130:2073S-2085S.
Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. <i>J Clin Lab Anal.</i> 1997 11:287-313
Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. <i>Nat Clin Pract Oncol.</i> 2005 Oct;2(10):518-25.
Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. <i>Crit Rev Food Sci Nutr.</i> 1997 37:771-785.
Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Sci Food Agric.</i> 2000 80:1073–1080.
Uenishi T, Hirohashi K, Kubo S, Hamba H, Ikebe T, Yamamoto T, Tanaka H, Wakasa K, Haba T, Kinoshita H. A pancreatic anaplastic carcinoma of spindle-cell form. <i>Int J Pancreatol.</i> 1999 Dec;26(3):201-4.
Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R, Agarwal C. Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats. <i>Mol Carcinog.</i> 2010 Jul;49(7):641-52.
Wainfan E, Dizik M. Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats. <i>Carcinogenesis.</i> 1987 8:615-617.
Wei DZ, Yang JY, Liu JW, Tong WY. Inhibition of liver cancer cell proliferation and migration by a combination of (-)-epigallocatechin-3-gallate and ascorbic acid. <i>J Chemother.</i> 2003 Dec;15(6):591-5.
Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. <i>Science.</i> 2002 296:695-698.
Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. <i>Carcinogenesis.</i> 1991 12:2109-2114
Zhang K, Das NP. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione transferases. <i>Biochem Pharmacol.</i> 1994 47:2063–2068.
Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. <i>Carcinogenesis.</i> 1999 20:1737-1745.

