



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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΟΣΤΡΥΧΟ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**

ΜΠΑΤΖΗΛΙΩΤΗ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**Επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχο στην έκφραση παραγόντων
που επηρεάζουν την αγγειογένεση**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος : Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λιαδάκη Καλλιόπη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, καθώς και για όσα πολύτιμα μου δίδαξε.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον λέκτορα κ. Στάγκο Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή του τόσο κατά την εκτέλεση του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών είχε βρεθεί ότι εκχύλισμα από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης έχει αγγειογενετική δράση. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης του εκχυλίσματος σε παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και πιο συγκεκριμένα στον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF), στον παράγοντα 1α επαγόμενος από υποξία (HIF-1α), στην κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) καθώς και στην πρόκληση απόπτωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926. Αρχικά, εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι σε συγκέντρωση 100μg/ml υπάρχει απόπτωση των κυττάρων κατά 540%, αποδεικνύοντας ότι η αναστολή της αγγειογένεσης που προκαλεί το εκχύλισμα οφείλεται εν μέρει στον μηχανισμό αυτόν. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στην έκφραση του VEGF με την ανοσοενζυμική μέθοδο VEGF-ELISA, δείχνοντας ότι υπάρχει αναστολή της έκφρασής του κατά 13% και 39% σε συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 50 μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην αναστολή του VEGF. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η αναστολή του VEGF προκαλεί μεταξύ των άλλων και απόπτωση. Επιπλέον, στους αγγειογενετικούς παράγοντες HIF-1α και COX-1 που εξετάστηκαν με τη μέθοδο Western Blot, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα του βόστρυχου δεν είχε καμιά επίδραση στην έκφρασή τους. Αυτό καταδεικνύει ότι θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί σε πιο μοριακό μονοπάτι οφείλεται η αναστολή του VEGF.

ABSTRACT

In a previous study of the laboratory of Animal Physiology, it was found that the bostryx extract from the Asyrtiko Santorini's variety has angiogenic effect. The aim of the present work was to investigate the effects of the extract on factors that are involved in angiogenesis, namely the vascular endothelial growth factor (VEGF), the hypoxia-induced factor 1 α (HIF-1 α), the cyclooxygenase-1 (COX-1) as well as the ability to induce apoptosis in the endothelial cell line EAhy926. At first, it was studied the ability of the extract to induce apoptosis (programmed cell death) with the immunosorbent method of ELISA. The results showed that the extract induced the apoptosis in the cells suggesting that the inhibition of angiogenesis is partially attributed to this mechanism. Also, it was studied the effect of the extract on the expression of VEGF, with the immunosorbent method of VEGF-ELISA. The results showed that the extract inhibited the expression of VEGF indicating that the anti-angiogenetic activity of extract is attributed, at least in part, to VEGF inhibition. It is remarkable that the inhibition of VEGF causes among others and apoptosis. Furthermore, the results from the Western Blot analysis showed that the extract did not have any influence on the expression of the angiogenic factors HIF-1 α and COX-1. Thus, more studies are needed to find out the molecular pathway involved in grape stem extract-induced VEGF inhibition.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract.....	6
Περιεχόμενα.....	7
1. Εισαγωγή	9
1.1 Σύσταση σταφυλιού.....	9
1.2 Ποικιλία παραγωγής οίνου Ασύρτικο Σαντορίνης.....	9
1.3 Σύσταση και ιδιότητες των πολυφαινολών.....	11
1.3.1 Χημεία και βιοχημεία των πολυφαινολών	11
1.3.2 Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων	11
1.3.3 Βιολογική δράση πολυφαινολών.....	14
1.4 Χημειοπροφύλαξη	17
1.5 Αγγειογένεση	18
1.5.1 Γενικά	18
1.5.2 Αγγειογένεση: ομοιόσταση και νόσος.....	18
1.5.3 Αγγειογένεση στις φυσιολογικές καταστάσεις	20
1.5.4 Αγγειογένεση στους όγκους.....	21
1.5.5 Αγγειογένεση και υποξία	23
1.6 Αγγειογενετικοί παράγοντες	24
1.7 Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων, VEGF (Vascular Endothelial Factor).....	28
1.7.1 Δομή και οργάνωση.....	28
1.7.2 Βιολογική δράση και λειτουργία του VEGF	29

1.7.3 Παράγοντες που επιδρούν στην έκφραση του VEGF	30
1.8 Παράγοντας 1α επαγόμενος από υποξία, HIF-1α (Hypoxia-induced Factor 1α)	31
1.9 Κυκλοοξυγενάση, COX (Cyclooxygenase)	32
1.10 Σκοπός του πειράματος.....	34
2 Υλικά και μέθοδοι.....	35
2.1 Χημικά αντιδραστήρια	35
2.2 Θρεπτικά υλικά	35
2.3 Διαδικασία εκχύλισης.....	35
2.4 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EAhy926	36
2.5 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	37
2.6 Ανοσοενζυμική μέθοδος VEGF-ELISA.....	38
2.7 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	40
2.8 Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot).....	43
3 Αποτελέσματα.....	45
3.1 Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.....	45
3.2 Προσδιορισμός της αναστολής του VEGF με την ανοσοενζυμική μέθοδο VEGF- ELISA.....	46
3.3 Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος του βοστρύχου στους αγγειογενετικούς παράγοντες HIF-1α και COX-1 με τη μέθοδο Western Blot	47
4. Συζήτηση	49
5. Βιβλιογραφία.....	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύσταση σταφυλιού

Το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα ο βότρυς του αποτελείται από δύο κύρια μέρη, το ξυλώδες μέρος (βότρυς ή τσαμπί), σε αναλογία 30% v/v και το εδώδιμο και οινοποιήσιμο μέρος (ρώγες), σε αναλογία 70% v/v.

Στο βόστρυχο το συστατικό που περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία είναι το νερό. Αρχικά, το ποσοστό του αποτελεί το 90% w/w ενώ σταδιακά μειώνεται λόγω της αυξανόμενης ξηρής ουσίας όπου συγκροτείται κυρίως από ξυλώδεις ουσίες.

Η ρώγα είναι ο κύριος καρπός της αμπέλου και η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή του κρασιού. Τα επιμέρους τμήματα της είναι ο φλοιός (10-20%) όπου αποτελείται σε ποσοστό 75-80% w/w από νερό, η σάρκα (74-87%) όπου αποτελεί το κύριο συστατικό του γλεύκους και τα γίγαρτα (3-6%) που σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να απουσιάζουν και είναι τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου(1).

1.2 Ποικιλία παραγωγής οίνου Ασύρτικο Σαντορίνης

Η ποικιλία παραγωγής οίνου Ασύρτικο Σαντορίνης είναι μία από τις σημαντικότερες λευκές Ελληνικές ποικιλίες των νησιωτικών περιοχών του Νοτίου Αιγαίου. Λόγω των εξαιρετικών του ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών (παραγωγή γλεύκους υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρα αλλά και υψηλής ολικής οξύτητας), έχει επεκταθεί και καλλιεργείται και σε άλλα μέρη της Ελλάδος. Στη Χαλκιδική συμμετέχει στη ζώνη παραγωγής οίνων ονομασίας προέλευσης «Πλαγιές του Μελίτων». Οι σταφυλές του είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδροκωνικού σχήματος, πυκνές έως μέτρια πυκνές και οι ράγες του είναι μετρίου μεγέθους κυλινδροκωνικού σχήματος (Εικόνα 1). Στις περιοχές εκτός της Σαντορίνης, το Ασύρτικο διαμορφώνεται σε κυπελλωτά ή γραμμωτά σχήματα και δέχεται κλάδεμα μακρύτερο (3-4 οφθαλμούς), ενώ στη Σαντορίνη διαμορφώνεται στα χαρακτηριστικά καλαθωτά σχήματα (κουλούρια) (Εικόνα 2).



Εικόνα 1. Σχήμα σταφυλής της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης



Εικόνα 2. Χαρακτηριστικά καλαθωτά σχήματα της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης

1.3 Σύσταση και ιδιότητες των πολυφαινολών

1.3.1 Χημεία και βιοχημεία των πολυφαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι ουσίες ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν χαρακτηριστικό συστατικό των φυτών, ή ακόμα και κάποιου συγκεκριμένου οργάνου ή ιστού του φυτού(3). Οφείλουν το όνομά τους στον αρωματικό δακτύλιο που φέρουν στο μόριό τους, ο οποίος περιέχει ένα ή περισσότερα υποκατάστατα υδροξυλίων(4). Μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν στο μόριο τους και των δομικών στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια, και τα λιγνάνια. Βιογενετικά προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια, του σικιμικού οξέος και οξικού οξέος(5).

1.3.2 Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

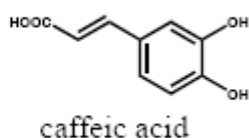
Παράγωγα του φαινολικού οξέος

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι λεγόμενες μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι μονομοριακά παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος.

Κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης των σταφυλών της αμπέλου έχουν εντοπιστεί ότι σχηματίζονται 6 παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (Σαλικυλικό, π-Υδροξυβενζοϊκό, Γαλλικό, Πρωτοκατεχοϊκό, Βανιλικό και Συριγγικό οξύ) και 4 παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (π-Κουμαρικό, Καφεϊκό, Χλωρογενικό και Φελουρικό οξύ) (Εικόνα 3). Οι διάφορες ενώσεις αυτές προκύπτουν από την αντικατάσταση υδρογόνου από υδροξυ ή μεθοξυ- ομάδες. Οι διάφορες αυτές ενώσεις κατά την οινοποίηση εκχυλίζονται και απαντώνται στους οίνους σε ποσότητες 100-200mg/L στους ερυθρούς και 10-20mg/L στους λευκούς. Ελεύθερες μορφές των ενώσεων αυτών απαντώνται κυρίως στους ερυθρούς οίνους, λόγω αντιδράσεων υδρόλυσης ή θερμικής διάσπασης. Αρκετές ενώσεις κινναμωμικού οξέος απαντώνται

στα ερυθρά κρασιά, αλλά σε ελεύθερη μορφή μόνο σε μικρές ποσότητες ανιχνεύονται, δεδομένου ότι εστεροποιούνται με το τρυγικό οξύ. Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα, αλλά παίρνουν κιτρινωπό χρώμα λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων. Από οργανοληπτικής απόψεως δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή άρωμα. Είναι όμως πρόδρομες ενώσεις πτητικών αλκοολών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς (*Bretanomyces* και *Βακτήρια*).

Οι ενώσεις αυτές στα διάφορα μέρη της σταφυλής απαντώνται ως εστέρες ή ως ετεροζίδια. Κατά την οиноποίηση και την παραμονή των οίνων εξελίσσεται μια βραδεία υδρόλυση και έτσι προκύπτουν οι ελεύθερες μορφές των ενώσεων αυτών στους οίνους(2).

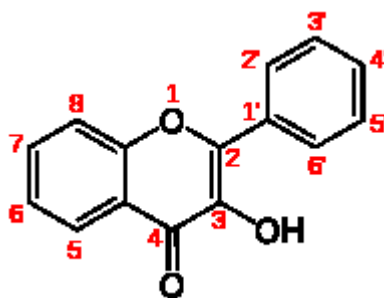


Εικόνα 3. Χημική δομή του καφεϊκού οξέος

Φλαβονοειδή

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες είναι χρωστικές περισσότερο ή λιγότερο έντονου κίτρινου χρώματος οι οποίες απαρτίζονται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται με ένα οξειδωμένο ετεροκυκλικό. Οι πιο συχνές από τις ενώσεις αυτές είναι οι φλαβονόλες οι οποίες είναι κίτρινες χρωστικές και απαντώνται τόσο στους φλοιούς των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών. Σε μικρότερη έκταση απαντώνται οι φλαβανόνες οι οποίες δεν αποτελούν συστατικά των σταφυλών όμως ανιχνεύονται σε οίνους οι οποίοι έχουν παλαιώσει σε δρύινα βαρέλια και ως εκ τούτου προέρχονται από το ξύλο της δρυός. Οι φλαβονόλες χαρακτηρίζονται από την παρουσία στη θέση 3' του μορίου τους ενός ενεργού -OH (Εικόνα 4). Στα σταφύλια αυτές οι ουσίες απαντώνται υπό την γλυκοσιδική τους μορφή. Διαφοροποιούνται ανάλογα με την αντικατάσταση των περιφερειακών H⁺ από OH⁻ και σχηματίζουν καιμπερόλη, κερκετίνη και μυρικιτρίνη. Οι τρεις αυτές χρωστικές απαντώνται τόσο

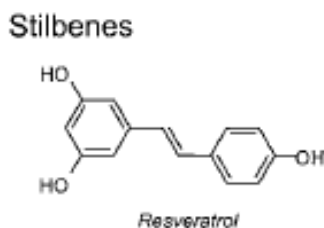
στις ερυθρές ποικιλίες όσο και στις λευκές και έχουν κίτρινο χρώμα. Αυτές οι ενώσεις εντοπίζονται στους ερυθρούς οίνους υπό την άγλυκη μορφή καθόσον υδρολύονται κατά τη ζύμωση και η συγκέντρωσή τους είναι της τάξεως των 100mg/L. Στα λευκά κρασιά όπου η ζύμωση εξελίσσεται απουσία των φλοιών η συγκέντρωσή τους είναι της τάξεως των 1-3mg/L(2).



Εικόνα 4. Χαρακτηριστική χημική δομή φλαβονολών

Στιλβένια

Είναι μια οικογένεια ενώσεων που αποτελούν πιο σύνθετες φαινόλες και απαντάται στους καρπούς της αμπέλου και με την οينوποίηση περνά και στα κρασιά. Το μόριο του στιλβενίου έχει δύο βενζοϊκούς δακτυλίους οι οποίοι γενικώς συνδέονται με ένα αιθάνιο ή ένα αιθυλένιο (Εικόνα 5). Μεταξύ αυτών των δύο trans-ισομερών, η ρεσβερατρόλη ή 3,5,4' τριυδροξυστιλβένιο παράγεται από την άμπελο ως αντίδραση σε μολύνσεις από μύκητες. Η ρεσβερατρόλη η οποία εντοπίζεται στους φλοιούς κυρίως εκχυλίζεται κατά την ζύμωση ερυθρών κρασιών και φαίνεται να έχει ευεργετική δράση στην υγεία του ανθρώπου. Η περιεκτικότητα των κρασιών κυμαίνεται από 1-3mg/L. Πρόσφατες έρευνες διαπίστωσαν ότι απαντώνται αρκετά oligομερή της ρεσβερατρόλης στο είδος *Vitis vinifera*(2).



Εικόνα 5. Χαρακτηριστική δομή στυλβενίων

Λιγνάνια

Ανήκουν στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων και όταν βρίσκονται στα φυτά συμπεριφέρονται ως αδρανή οιστρογόνα και μόνο μετά το μεταβολισμό τους από τη μικροβιοχλωρίδα του εντέρου μετατρέπονται σε δραστικά λιγνάνια(6). Συντίθεται από δύο μόρια φαινυλ-προπανόνης και ο λιναρόσπορος είναι η κυριότερη πηγή τους, ενώ είναι εμφανή και σε τρόφιμα που είναι πλούσια σε φυτικές ίνες(5).

1.3.3 Βιολογική δράση πολυφαινόλων

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε αφθονία σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης(φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, ξηροί καρποί κλπ.) και ποτά (κρασί, μύρα, τσάι, κακάο). Συγκεκριμένες πολυφαινόλες, όπως η κερκετίνη, συναντώνται σχεδόν σε όλα τα φυτικά προϊόντα (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, χυμούς φρούτων, τσάι και κρασί κλπ.) ενώ άλλα απαντούν σε συγκεκριμένα προϊόντα, όπως οι φλαβόνες στα εσπεριδοειδή, οι ισοφλαβόνες στα προϊόντα σόγιας και η φλοριζίνη στα μήλα(7).

Οι βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των πολυφαινόλων έχουν κατά καιρούς διερευνηθεί, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη βιοδραστικότητά τους. Από τις έρευνες που έχουν γίνει, έχει διαπιστωθεί ότι οι πολυφαινόλες διαθέτουν σημαντική αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, αντιμεταλλαξιογόνο και αγγειοδιασταλτική δράση. Αρκετές από τις δράσεις αυτές σχετίζονται με τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων, δηλαδή στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ποικίλες ελεύθερες ρίζες, όπως τις υπεροξυ-ρίζες των λιπιδίων που συντίθεται στα

κύτταρα ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών(8,9).

Αντιαγγειογενετική δράση των σταφυλίων

Αρκετές φυσικής προέλευσης πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, με επακόλουθο να παρεμποδίζουν και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων στα ζώα. Για παράδειγμα, η trans-ρεσβερατρόλη καταστέλλει την *in vivo* αγγειογένεση που επάγεται από τους παράγοντες FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) και VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ενώ αναστέλλει άμεσα τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων(10). Αντίστοιχα, η κερκετίνη είναι μια πολυφαινόλη με αντίστοιχες βιολογικές ιδιότητες με την trans-ρεσβερατρόλη, σε μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις. Η παρεμποδιστική δράση αυτών των μορίων είναι δυνατόν να συνδεθεί και με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τις πρωτεάσες που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης, όπως για παράδειγμα τις MMPs (Matrix MetalloProteinases)(11).

Αντιοξειδωτική δράση

Η κύρια αντιοξειδωτική δράση που σχετίζεται με τις πολυφαινόλες είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο, συγκεκριμένες πολυφαινόλες μπορεί να επάγουν ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η απέκκριση οξειδωτικών παραγόντων από τον οργανισμό, ή άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως τη μεταλλοθειονίνη ή το κυτόχρωμα P450 (CYPs) ή να αναστέλλουν ένζυμα όπως τις κυκλοοξυγενάσες ή λιποξυγενάσες που έχουν οξειδωτικές ιδιότητες ή να προστατεύουν άλλα αντιοξειδωτικά ενδογενή ή εξωγενή, όπως τη γλουταθειόνη, τη βιταμίνη E, το β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ή την LDL από την οξείδωση.

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση λειτουργούν ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών και μπορούν

επίσης να δεσμεύουν μέταλλα τα οποία καταλύουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπως π.χ. στην περίπτωση του ταννικού οξέος, που δημιουργώντας σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου, παρεμποδίζει τη σύνθεση ριζών υδροξυλίου από την αντίδραση Fenton(12). Οι πολυφαινόλες δρουν κυρίως ως δότες ατόμου H στις ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδραση: $RO\bullet + PPH \rightarrow ROH + PP\bullet$, όπου ο σχηματιζόμενος ενδιάμεσος μεταβολίτης, η φαινοξυ-ρίζα $P\bullet$, είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο και δύσκολα επιτρέπει μία νέα αλυσιδωτή αντίδραση με επίθεση O_2 . Η ρίζα αυτή σταθεροποιείται με διασπορά των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό δακτύλιο κατά το φαινόμενο του συντονισμού(13). Επίσης μπορεί να δράσει ως τερματιστής της αλυσιδωτής αντίδρασης των ριζών αντιδρώντας με άλλες ρίζες όπως την παρακάτω αντίδραση: $RO\bullet + PP\bullet \rightarrow ROPP$.

Προκειμένου μια πολυφαινόλη να θεωρείται αντιοξειδωτική θα πρέπει να ικανοποιεί δύο προϋποθέσεις: να είναι ικανή να καθυστερεί, να αναβάλλει ή να εμποδίζει την αυτοοξειδωση ή τη ρυθμιζόμενη από ελεύθερες ρίζες οξείδωση σε επίπεδα χαμηλά, και η ρίζα που δημιουργείται να είναι σταθερή, μέσω ενδομοριακής δέσμευσης του H σε περαιτέρω οξείδωση(8). Στην ομάδα των φλαβονοειδών ανήκουν πολυφαινόλες με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, με κύριο εκπρόσωπο και πιο ευρέως μελετημένη την κερκετίνη. Η κερκετίνη είναι μία από τις πιο σημαντικές πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου η οποία είναι υπεύθυνη για τον αποδέσμευση των ηλεκτρονίων από τον B δακτύλιο, στην παρουσία του ο-διαφαινολικού τμήματος στον B δακτύλιο, ικανό να λειτουργήσει ως δότης H για να σταθεροποιηθούν οι ελεύθερες ρίζες και στις ομάδες OH στη θέση 3 και 5, που αυξάνουν την ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Γενικά η θέση και ο βαθμός υδροξυλίωσης είναι σημαντικά για την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, όπως των φλαβονοειδών. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι αναγκαία για να είναι μία πολυφαινόλη αντιοξειδωτική.

Η δυνατότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τη μορφή των πολυφαινολών και μειώνεται με την παρουσία σακχάρου στο μόριό τους. Οι γλυκοζίτες συνήθως δεν είναι αντιοξειδωτικές ουσίες, αν και τα αντίστοιχα ελεύθερα μόριά τους μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Αν και οι συζευγμένες πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις

και να δεσμεύουν ενεργά μόρια οξυγόνου ή αζώτου, η ικανότητά τους αυτή είναι κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ελεύθερες πολυφαινόλες(14).

1.4 Χημειοπροφύλαξη

Ως χημειοπροφύλαξη ορίζεται η φαρμακολογική προσέγγιση που έχει στόχο να ανακόψει ή να αναστρέψει, είτε την έναρξη, είτε την πρόοδο της καρκινογένεσης και επομένως να καθυστερήσει ή να εμποδίσει την ανάπτυξη καρκίνου (15). Στόχος της χημειοπροφύλαξης είναι η μείωση της επίπτωσης του καρκίνου, με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες από τους χημειοπροληπτικούς παράγοντες και με το μικρότερο δυνατό κόστος σε «υγιή» πληθυσμό. Με την χρήση των χημειοπροληπτικών παραγόντων, φαρμακευτικών ή φυσικών, ενισχύονται ενδογενείς βιολογικοί μηχανισμοί που προστατεύουν τον οργανισμό από την ανάπτυξη κλώνων νεοπλασματικών κυττάρων, γεγονός που τους καθιστά καθοριστικούς στην στρατηγική πρόληψης του καρκίνου (16). Η σπουδαιότητα της χημειοπρόληψης εδραιώθηκε με την επίδραση της ταμοξιφαίνης, ενός τροποποιητή των οιστρογονικών υποδοχέων, στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού, αλλά και στην ελάττωση προκαρκινικών αλλοιώσεων(17).

Οι χημειοπροληπτικοί παράγοντες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν οι παράγοντες εκείνοι που αναστέλλουν την έναρξη της καρκινογένεσης δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ενεργοποιημένα καρκινογόνα παράγωγα, είτε ενισχύοντας επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Στη δεύτερη μεγάλη κατηγορία ανήκουν οι παράγοντες εκείνοι που αναστέλλουν την μετάπτωση, προαγωγή και εξέλιξη των προνεοπλασματικών κυττάρων σε νεοπλασματικά, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή καθοριστικών γονιδίων, υπεύθυνων για τη λειτουργία οδών μεταβολισμού, ανάπτυξης και διαφοροποίησης, είτε ενισχύοντας την οργάνωση του DNA σε νουκλεοσώματα, σταθεροποιώντας το γενετικό υλικό (16) Επίσης στους χημειοπροληπτικούς παράγοντες ανήκουν και τα ΜΣΑΦ (Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα) και οι αντιοξειδωτικές ουσίες (18).

1.5 Αγγειογένεση

1.5.1 Γενικά

Αγγειογένεση ονομάζεται η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων και η ανάπτυξη αγγειακού δικτύου σε φυσιολογικές καταστάσεις ή κατά τη διαδρομή διαφόρων νοσημάτων. Ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1935 από τον Hertig, για να περιγράψει το σχηματισμό νέων αγγείων σε πλακούντα πιθήκων(19). Αργότερα παρατηρήθηκε ότι η αγγειογένεση κατέχει κεντρική θέση στην παθογένεια πολλών νοσημάτων όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, κ.ά.(20).

Οι γνώσεις γύρω από την αγγειογένεση προήλθαν κυρίως από την εκτεταμένη έρευνα στους συμπαγείς όγκους. Οι πρώτες μικροσκοπικές παρατηρήσεις της αγγείωσης των όγκων έγιναν από τους Ide et al. το 1939 μετά από εμφύτευση καρκινικών κυττάρων σε αυτί κουνελιών. Ακολούθησαν οι Algire et al. το 1945 που μελέτησαν την ικανότητα των όγκων να αναπτύσσουν νέο τριχοειδικό ενδοθήλιο, συνεχόμενο του ενδοθηλίου των αγγείων των γειτονικών υγιών ιστών, μετά από μεταμόσχευση καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια και εισήγαγαν τον όρο αγγειογένεση των όγκων ή νεοαγγειογένεση. Ακολούθησαν πολλές μελέτες *in vitro* στις οποίες διαπιστώθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παίρνουν τη μορφή μικρών όγκων διαμέτρου 1-2 mm, αλλά εάν αποτύχει η δημιουργία αγγείων, η ανάπτυξη τους τερματίζεται, ενώ με την εμφάνιση αγγειογενετικής δραστηριότητας αυξάνουν σε μέγεθος.

1.5.2 Αγγειογένεση: ομοιόσταση και νόσος

Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι φυσιολογικό φαινόμενο στον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως στα παιδιά αλλά και στους ενήλικες. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής αναπτύσσεται το εκτενές δίκτυο αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών που ανευρίσκεται στο ώριμο ανθρώπινο σώμα. Η διεργασία αυτή παράγει αρχικά ένα δίκτυο αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων που θα δημιουργήσουν στη συνέχεια μεγάλα αιμοφόρα αγγεία. Αργότερα, η διαδικασία της αγγειογένεσης συνεχίζεται με την αναδόμηση του

δικτύου αυτού προς νέα μικρότερα αιμοφόρα αγγεία και τριχοειδή που συμπληρώνουν το κυκλοφορικό σύστημα του παιδιού.

Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων, μολονότι είναι σχετικά ασύνηθες, λαμβάνει χώρα και στους ενήλικες. Τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων των ενηλίκων σχηματίζονται από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα που σπάνια διαιρούνται. Η κυτταρική διαίρεση αυτών των κυττάρων συμβαίνει κατά μέσο όρο κάθε τρία έτη, ωστόσο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες η αγγειογένεση μέσω κάποιων μηχανισμών μπορεί να προκαλέσει τη διαίρεσή τους. Στις γυναίκες, η αγγειογένεση είναι ενεργός λίγες ημέρες μηνιαίως, καθώς νέα αγγεία σχηματίζονται στη μήτρα κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου. Επίσης, η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την αναγέννηση των ιστών και κατά την επούλωση των τραυμάτων.

Εκτός όμως από τις φυσιολογικές περιπτώσεις, η αγγειογένεση ενεργοποιείται και στη διάρκεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως η ανάπτυξη και η διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν μόρια που αποστέλλουν «σήματα-ερεθίσματα» στο γύρω φυσιολογικό ιστό του ξενιστή για ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων παραγωγής πρωτεϊνών, που προάγουν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων εντός των καρκινικών δομών. Τα αγγεία αυτά παρέχουν θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα και απομακρύνουν τα προϊόντα του μεταβολισμού.

Η αγγειογένεση επίσης συμβάλλει στην παθογένεια πολλών χρόνιων, κυρίως φλεγμονωδών νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα, το άσθμα, η πνευμονική ίνωση, η ψωρίαση, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και πολλές άλλες παθήσεις των αρθρώσεων, των πνευμόνων ή του εντέρου. Ο φλεγμονώδης ιστός είναι υποξικός. Η υποξία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση ουσιών που προάγουν τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στα ήδη υπάρχοντα αγγεία με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων αγγείων(23,24).

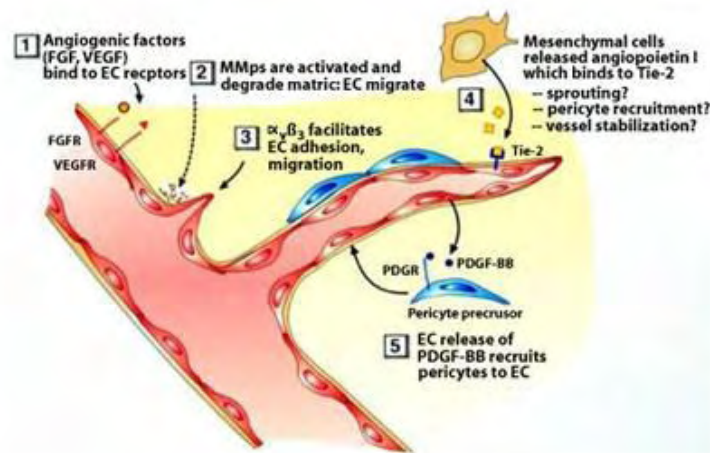
1.5.3 Αγγειογένεση στις φυσιολογικές καταστάσεις

Ο σχηματισμός των φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνει δύο συγγενείς αλλά ξεχωριστές διαδικασίες. Η πρώτη λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και αφορά τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από πρόδρομα κύτταρα, τους αγγειοβλάστες και τον επακόλουθο σχηματισμό του αγγειακού δικτύου του εμβρύου, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει το σχηματισμό νέων τριχοειδών από τα προϋπάρχοντα αγγεία τόσο στο έμβρυο όσο και στους ενήλικες.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στην αγγειογένεση παρατηρούνται διαδοχικά: ενεργοποίηση του αγγειογενετικού μηχανισμού, εκφύλιση της βασικής μεμβράνης, μετανάστευση κυττάρων, εισβολή της εξωκυττάριας ουσίας, πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και τελικά ο σχηματισμός του τριχοειδικού αυλού. Η νεοσχηματιζόμενη μικροκυκλοφορία ωριμάζει με την ενεργοποίηση του μηχανισμού της «λύσης» που περιλαμβάνει αναστολή του πολλαπλασιασμού, αναδόμηση της βασικής μεμβράνης και το σχηματισμό συνάψεων μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, τα νεοσχηματισμένα αγγεία ωθούν τα κύτταρα που βρίσκονται γύρω από το ενδοθήλιο να παρέχουν στήριξη. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται περικύτταρα στα μικρά τριχοειδή και λεία μυϊκά κύτταρα στα μεγαλύτερα αγγεία. Τα περιενδοθηλιακά υποστηρικτικά κύτταρα είναι γνωστό ότι δρουν ως παράγοντας επιβίωσης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα(25,26).

Η φυσιολογική αγγειογένεση είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία και ελέγχεται από πλήθος παραγόντων με αυτοκρινή και παρακρινή δράση (Εικόνα 6). Απαιτεί τη συνεργασία των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Από την ενεργοποίηση των γονιδίων ως τη δράση στους ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στα κύτταρα στόχους του ενδοθηλίου, απαιτείται η μεσολάβηση δευτερευόντων ρυθμιστών. Ο εξωκυττάριος χώρος διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο σαν δεξαμενή των διαλυτών παραγόντων της αγγειογένεσης. Επιπλέον, η ηπαρίνη, η πλασμίνη και οι φωσφολιπάσες τροποποιούν τη δράση των παραγόντων που παρεμβαίνουν στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρά το γεγονός όμως ότι πολλοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης έχουν ταυτοποιηθεί έως σήμερα, μελέτες σε πειραματόζωα ανέδειξαν ότι ελάχιστα συμπλέγματα υποδοχέων τυροσινικής κινάσης καθορίζουν τη φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη(27).

Processes in Angiogenesis



Klagsbrun & Moses, Chemistry & Biology, 1999

Εικόνα 6. Διαδικασίες της αγγειογένεσης

1.5.4 Αγγειογένεση στους όγκους

Η διαδικασία ανάπτυξης αγγειακού δικτύου στους όγκους ονομάζεται νεοαγγειογένεση. Η αγγείωση των όγκων όμως παρουσιάζει ανατομικές, φυσιολογικές και ανοσολογικές ιδιότητες διαφορετικές από αυτές των υγιών ιστών.

Σε αντίθεση με τη φυσιολογική αγγειογένεση, τα αγγεία των όγκων συχνά παρουσιάζουν ανωμαλίες όπως η πλήρης έλλειψη σύνδεσης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και βασικής μεμβράνης, η ελικοειδής πορεία και οι αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις. Επίσης, η ροή του αίματος μέσα στον όγκο είναι βραδεία, με διαφυγή αίματος σε πολλά σημεία, ενώ πολλά αγγεία δεν διαθέτουν περιενδοθηλιακό υποστηρικτικό υπόστρωμα.

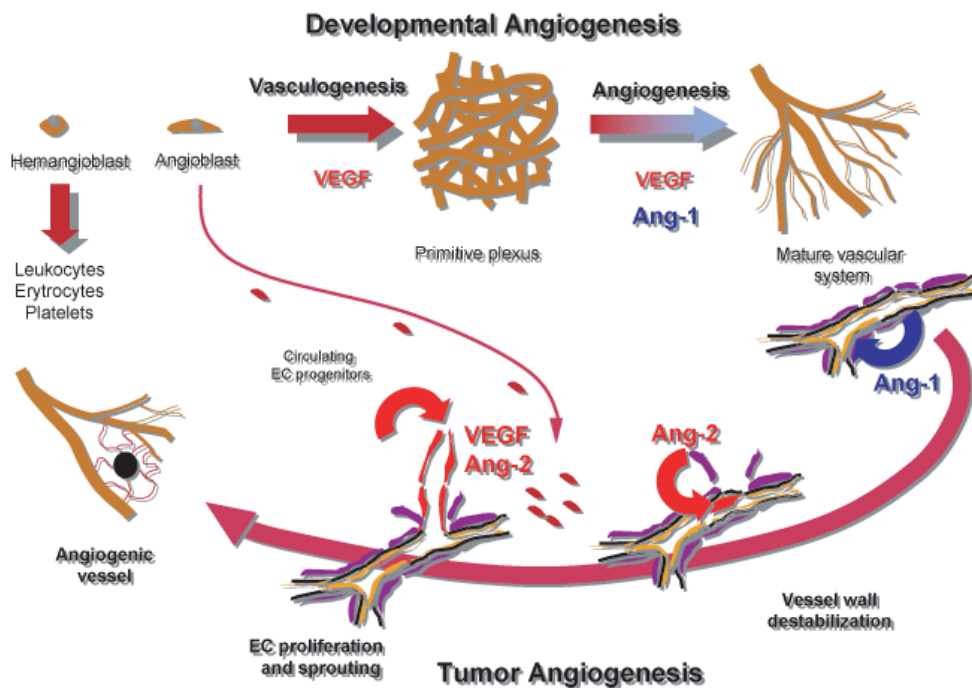
Η έναρξη της αγγειογενετικής δραστηριότητας σε έναν όγκο εξαρτάται από μια κρίσιμη ισορροπία ανάμεσα στους επαγωγείς και τους αναστολείς της αγγειογένεσης, ο καθένας εκ των οποίων παρουσιάζεται σε συγκεκριμένα στάδια της ογκογένεσης (Εικόνα 7). Στην αρχή, οι όγκοι έχουν πτωχή αγγείωση, ενώ μετά από

κάποιο λανθάνοντα χρόνο αρχίζει η έντονη ανάπτυξη των αγγείων και ο όγκος γίνεται πιο επιθετικός(28).

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για την εξήγηση της αγγειογένεσης των όγκων. Ο πρώτος διατυπώθηκε από τον Folkman το 1984 και προτείνει ότι αρχικά στους συμπαγείς όγκους εκκρίνονται πρωτεολυτικά ένζυμα από τα μετατριχοειδικά φλεβίδια του υγιούς ιστού που βρίσκεται σε συνέχεια με τον όγκο. Στη συνέχεια, γίνεται αποδόμηση της μεσοκυττάριας ουσίας, ακολουθεί πολλαπλασιασμός και μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων προς τον όγκο τα οποία σχηματίζουν τρεις διαφορετικές ζώνες, τη ζώνη μετανάστευσης, τη ζώνη πολλαπλασιασμού και τη ζώνη ωρίμανσης. Στην τελευταία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα οργανώνονται σε σωληνώδεις αγγειακούς σχηματισμούς που αναστομώνονται μεταξύ τους και με τα αγγεία του ιστού-ξενιστή και σχηματίζεται η αρχέγονη κυκλοφορία του όγκου(29).

Σύμφωνα με τη δεύτερη άποψη που διατυπώθηκε από τους Hori et al. το 1990, μέσα στον όγκο αναπτύσσονται τριχοειδή αγγεία που προέρχονται κυρίως από τα προτριχοειδικά αρτηρίδια του ξενιστή. Η αγγείωση του όγκου επεκτείνεται αποδιοργανώνοντας τα αγγεία του ξενιστή με σχηματισμό πολλών διακλαδώσεων και αναστομώνσεων μεταξύ των αγγείων του όγκου με εκείνα του ξενιστή(30).

Τα δύο αυτά μοντέλα διαφέρουν μεταξύ τους, το πρώτο είναι κυρίως μηχανιστικό και εστιάζεται περισσότερο στις ικανότητες του ενδοθηλιακού κυττάρου για μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, ενώ το δεύτερο δίνει περισσότερο έμφαση σε μια δυναμική διαδικασία που εμπλέκει το αγγειακό δίκτυο στο σύνολό του.



Εικόνα 7. Αγγειογένεση στους όγκους

1.5.5 Αγγειογένεση και υποξία

Καθώς ο συμπαγής όγκος μεγαλώνει, μερικά κύτταρα αναπόφευκτα απομακρύνονται από το θρεπτικό αγγειακό στρώμα και η παροχή συστατικών και οξυγόνου σε αυτά τα κύτταρα περιορίζεται. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μεταβολικό στρες και κυτταρική υποξία που αποτελεί ερέθισμα-σήμα για τη δημιουργία πρόσθετων αιμοφόρων αγγείων. Η υποξία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του κυτταρικού μεταβολισμού και την ανάπτυξη ανώριμων, αρχιτεκτονικά αποδιοργανωμένων με μεγάλη διαπερατότητα αιμοφόρων αγγείων που διευκολύνουν το πέρασμα των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία. Έτσι, η υποξία συμβάλλει στην ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου και συντηρεί την εισβολή και μετάστασή του.

Οι λόγοι για τους οποίους οι όγκοι γίνονται υποξικοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι αλλά πιθανώς σε αυτό συμβάλλουν πολλοί μηχανισμοί. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ταχεία ανάπτυξη, η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από τα καρκινικά κύτταρα, η φτωχή λεμφαδενική παροχέτευση των όγκων που οδηγεί σε αύξηση της πίεσης του ενδιάμεσου χώρου, το όξινο pH και η ενδοογκική διαφυγή του πλούσιου σε οξυγόνο αίματος μέσα από την ανώριμη αγγείωση. Επιπλέον τα αγγεία

του όγκου δεν πετυχαίνουν πάντα τον εφοδιασμό του όγκου με αίμα, καθώς η ασυνεχής βασική μεμβράνη των ανώριμων νεοαγγείων επιτρέπει την εξαγγείωση πλάσματος και πρωτεϊνών, προκαλώντας αύξηση της ενδοογκικής πίεσης με τελικό αποτέλεσμα τη φτωχή παροχή οξυγόνου.

Για να αυξήσουν λοιπόν τη διάθεση οξυγόνου ή να μειώσουν την κατανάλωση του, τα κύτταρα του όγκου τροποποιούν τη μεταγραφή ευρείας κλίμακας γονιδίων τα πρωτεϊνικά παράγωγα των οποίων χρησιμεύουν είτε ως προαγγειογενετικοί παράγοντες είτε ως γλυκολυτικά ένζυμα που μειώνουν τον κυτταρικό μεταβολισμό της γλυκόζης.

Είναι σήμερα γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων γονιδίων ρυθμίζονται από την υποξία όπως αυτά που κωδικοποιούν την ερυθροποιητίνη, τον VEGF, κ.ά.(31).

1.6 Αγγειογενετικοί παράγοντες

Η αγγειογένεση ρυθμίζεται από επαγωγείς και αναστολείς (Πίνακας 1 και 2 αντίστοιχα). Φυσιολογικά, οι αναστολείς κυριαρχούν αποτρέποντας τη συνεχή αγγειογενετική δραστηριότητα. Όταν όμως προκύπτει η ανάγκη για νέα αιμοφόρα αγγεία, οι επαγωγείς της αγγειογένεσης παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους αναστολείς.

Πολλές πρωτεΐνες και διάφορα μόρια έχουν ταυτοποιηθεί ως αγγειογενετικοί παράγοντες και απελευθερώνονται κατόπιν ερεθίσματος για αύξηση ή αναστολή της αγγειογένεσης. Δύο πρωτεΐνες όμως φαίνεται να είναι οι σημαντικότερες για την αγγειογένεση, ο αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (b-FGF), που και οι δύο παράγονται από πολλούς τύπους καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων. Οι παράγοντες αυτοί συνδέονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα με συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Η σύνδεση στον κατάλληλο υποδοχέα ενεργοποιεί μια σειρά από πρωτεΐνες που διαβιβάζουν το ερέθισμα στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το πυρηνικό αυτό σήμα τελικώς διεγείρει μια ομάδα γονιδίων στην παραγωγή των προϊόντων που απαιτούνται για την ανάπτυξη νέων ενδοθηλιακών κυττάρων και μία σειρά αντιδράσεων που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αιμοφόρων

αγγείων. Αρχικά, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν μεταλλοπρωτεΐνες, μία ειδική τάξη ενζύμων που αποδομούν τη μεσοκυττάρια ουσία και αποτελούνται από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Ο καταβολισμός της μεσοκυττάριας ουσίας επιτρέπει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς μεταναστεύουν στους περιβάλλοντες ιστούς, διαιρούνται και οργανώνονται σε κοίλα σωληνάκια που εξελίσσονται σταδιακά σε ώριμο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων.

Για την έναρξη της ανάπτυξης νέων αγγείων όμως δεν αρκεί μόνο η παρουσία των μορίων που προάγουν την αγγειογένεση αλλά και η καταστολή των αναστολέων της αγγειογένεσης, οι οποίοι φυσιολογικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων. Από τις ουσίες που αναστέλλουν την αγγειογένεση η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη και η θρομβοσπονδίνη φαίνεται ότι είναι οι πλέον σημαντικές. Μια ισορροπία λοιπόν μεταξύ της συγκέντρωσης των αναστολέων και των επαγωγέων καθορίζει αν θα ακολουθήσει ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων ή όχι(32).

Η ανακάλυψη των αναστολέων της αγγειογένεσης θέτει το ερώτημα αν τέτοια μόρια θα μπορούσαν θεραπευτικώς να διακόψουν ή να περιορίσουν την εμφάνιση νοσημάτων που παρουσιάζουν έντονη αγγειογενετική δραστηριότητα. Οι αναστολείς της αγγειογένεσης όπως η ενδοστατίνη και η αγγειοστατίνη έχουν ήδη δοκιμαστεί στη θεραπεία και στην επιβράδυνση των μεταστάσεων στους όγκους(33).

Πίνακας 1. Επαγωγείς της αγγειογένεσης

1. Βασικός και όξινος αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών, b- και a-FGF (basic and acidic fibroblast growth factor)
2. Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β και α, TGF-β και -α (transforming growth factor b and a)
3. Μεταλλοπρωτεϊνάσες της μεσοκυττάριας ουσίας, MMPs (matrix metalloproteinases)
4. Αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων, HGF (hepatocyte growth factor)
5. Ιντερλευκίνες, ILs (interleukins)
6. Παράγοντας νέκρωσης των όγκων, TNF (tumor necrosis factor)
7. Αγγειογενίνη (angiogenin)
8. Ερυθροποιητίνη, EPO (erythropoietin)
9. Αγγειοποιητίνη-1, Ang-1 (angiopoietin-1)
10. Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων, VEGF (vascular endothelial growth factor)
11. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, EGF (epidermal growth factor)
12. Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια, PDGF (platelet-derived growth factor)
13. Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας και αυξητική ορμόνη, IGF και GH (insulin-like growth factor and growth hormone)
14. Παράγοντας 1α επαγόμενος από υποξία, HIF-1α (hypoxia-induced factor 1α)
15. Θυμιδινική φωσφορύλαση, TP (thymidine phosphorylase) (pdecgf)
16. Κυκλοοξυγενάση, COX (cyclooxygenase)
17. Λεπτίνη (Leptin)

Πίνακας 2. Αναστολείς της αγγειογένεσης

1. Θρομβοσπονδίνη, TSP (thrombospondin)
2. Ενδοστατίνη (endostatin)
3. Αγγειοστατίνη (angiostatin)
4. Ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)
5. Αιμοπεταλιακός παράγοντας IV, PF-4 (platelet factor IV)
6. Ιντερφερόνη-α, IFN-α (interferon-α)
7. Αγγειοποιητίνη-2, Ang-2 (angiopoietin-2)
8. Ιντερλευκίνη-12, IL-12 (interleukin-12)
9. Τροπονίνη-I, Tn-I (troponin-I)
10. 2-Μεθοξυιστραδιόλη, 2-ME (2-methoxyestradiol)
11. Ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid)
12. Βαζοστατίνη (vasostatin)
13. Προλακτίνη και πλακουντιακό γαλακτογόνο, PRL και PL (Prolactin and placental lactogen)
14. Ειδικό προστατικό αντιγόνο, PSA (prostate specific antigen)

1.7 Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

1.7.1 Δομή και οργάνωση

Ο VEGF είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ παράλληλα λειτουργεί και ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα μονοκύτταρα, προσελκύοντας τα στο πεδίο της φλεγμονής και στους όγκους (34). Σήμερα ο VEGF θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της αγγειογένεσης, ενώ μαζί με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες συμμετέχει σε πλήθος φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων για τον άνθρωπο.

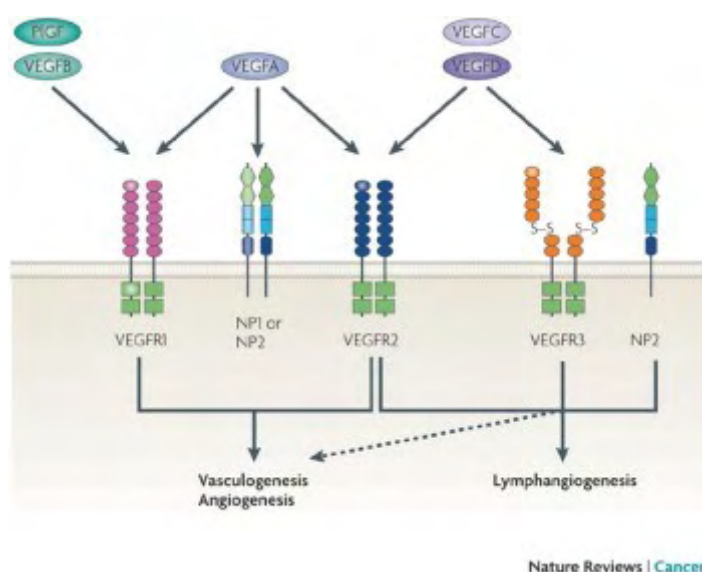
Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει έξι μέλη : τους VEGF-A (ή απλώς VEGF), VEGF –B, VEGF –C, VEGF –D, VEGF -E καθώς και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα PLGF(35).

Το ανθρώπινο γονίδιο VEGF –A (θέση 6p21-p12) οργανώνεται σε 8 εξόνια και μετά από εναλλακτική αποβολή εσώνιων διαμορφώνεται σε 5 διαφορετικές ισομορφές, οι πιο κοινές εκ των οποίων είναι οι VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 και VEGF206.

Οι υποδοχείς του VEGF (Εικόνα 8) βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και είναι οι εξής τρεις: VEGFR-1 (ή flt-1, fms-like tyrosine kinase), VEGFR-2 (ή flk-1/KDR, fetal liver kinase 1-murine homologue/ Kinase insert Domain containing Receptor-human homologue) και VEGFR-3 (flt-4). Οι VEGFR-1 και VEGFR-2 απαντώνται κυρίως στο ενδοθήλιο των αγγείων, ενώ ο VEGFR-3 βρίσκεται ως επί το πλείστον στο λεμφικό ενδοθήλιο(36).

Η σύνδεση του VEGF στον υποδοχέα VEGFR προκαλεί διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Στην συνέχεια, ενεργοποιούνται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια και τελικά πραγματοποιούνται πολλαπλές φωσφορυλιώσεις στο κυτταρόπλασμα. Τελικά γίνεται ενεργοποίηση παραγόντων που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαπερατότητα και η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ο VEGF-A διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση αυξάνοντας την μεταφορά οξυγόνου και των ενεργειακών υποστρωμάτων. Όλοι οι κυτταρικοί τύποι, συμπεριλαμβανομένων και των κυτταρικών όγκων, χρειάζονται οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας και την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Όταν οι ανάγκες του οργανισμού σε οξυγόνο δεν ικανοποιούνται, τότε η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως υποξία (Hypoxia). Η έκφραση του VEGF-A μπορεί να ρυθμιστεί όταν τα κύτταρα υπόκεινται σε υποξία ή υπογλυκαιμία (37).



Εικόνα 8. Υποδοχείς του VEGF

1.7.2 Βιολογική δράση και λειτουργία του VEGF

Ο VEGF αποτελεί έναν ειδικό ισχυρό μιτογόνο παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αγγεία, φλέβες, ή αρτηρίες αλλά και άλλων κυτταρικών πληθυσμών(38,39,40). Αποτελεί πρωταρχικό μεσολαβητή της φυσιολογικής και παθολογικής αγγειογένεσης που παρατηρείται για παράδειγμα μετά από αγγειακό τραυματισμό, στην επέκταση των όγκων, στην αμφιβληστροειδοπάθεια και στην ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας σε καταστάσεις υποξίας (41,42,43).

Η βιολογική δράση του VEGF περιλαμβάνει τη ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων μέσω επαγωγής πόρων και θυρίδων στο ενδοθήλιο(44), που σηματοδοτεί την έναρξη της αγγειογενετικής διαδικασίας. Η επιβίωση των ενδοθηλιακών

κυττάρων στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία εξαρτάται επίσης από τον VEGF. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα να αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη, να μεταναστεύουν και να σχηματίζουν αγγεία *in vitro*. Ο VEGF ρυθμίζει πολλαπλές ενδοθηλιακές βιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με την ομοιοστασία του καρδιαγγειακού συστήματος(45). Ο πολύπλευρος ρόλος του περιλαμβάνει ακόμη την έλξη-συλλογή πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων από το μυελό των οστών και την επαγωγή της διαφοροποίησης τους, όπως επίσης και την αναστολή διαφοροποίησης δενδριτικών κυττάρων. Ακόμη ο VEGF επάγει την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός ότι τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια περιέχουν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης του VEGF, την οποία εκκρίνουν όταν διεγείρονται, υποδεικνύει το ρόλο του στη φλεγμονή και την πήξη του αίματος. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα αιμοπετάλια ασθενών με καρκίνο περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης VEGF από τους υγιείς δότες. Ο VEGF έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πλήθος υγιών κυττάρων, αλλά υπερεκφράζεται σε καρκινικά ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού και του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.

1.7.3 Παράγοντες που επιδρούν στην έκφραση του VEGF

Η έκφραση του VEGF επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Έχει παρατηρηθεί, ότι ο καθοριστικότερος παράγοντας, ο οποίος έχει ως συνέπεια την έκφραση του VEGF, είναι η ιστική υποξία (46). Η ιστική υποξία οδηγεί στην παραγωγή του HIF-1, ο οποίος συνδέεται με περιοχή του γονιδίου του VEGF με αποτέλεσμα την μεταγραφή του (47). Άλλοι παράγοντες, που καθορίζουν την έκφραση του VEGF είναι οι κυτταροκίνες και ποικίλοι αυξητικοί παράγοντες, όπως την ιντερλευκίνη-1β(48), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (49)κ.α.

Οι πολλαπλές ιδιότητες του VEGF μαρτυρούν ότι ο κύριος ρόλος του είναι η αγγειογένεση, σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί ότι δρα αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας στην χημειοταξία και στον πολλαπλασιασμό τους(50). Άλλες ιδιότητες του VEGF σχετίζονται με την διαπερατότητα των μικροαγγείων. Ο VEGF αυξάνει την διαπερατότητα των φυσιολογικών αγγείων για τις πρωτεΐνες του πλάσματος, χωρίς όμως να προκαλεί βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή σημαντική φλεγμονώδη αντίδραση γύρω από

αυτά (51). Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ινώδους υποστρώματος γύρω από τα αγγεία, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων (52). Ο VEGF προκαλεί επιπλέον την παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και κατ' επέκταση σε αύξηση της ροής του αίματος, στάδιο προαπαιτούμενο για την αγγειογένεση. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο ρόλος του VEGF είναι καθοριστικός για την αγγειογένεση, καθώς και για την διατήρηση και ανάπτυξη των όγκων(53).

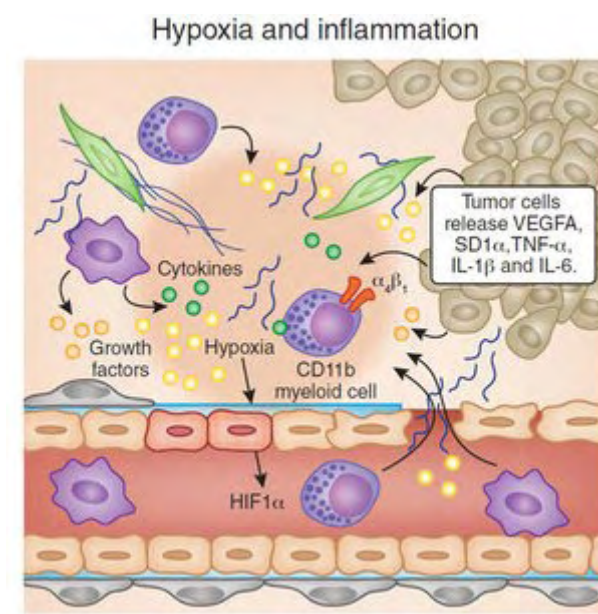
1.8 Παράγοντας 1α επαγόμενος από υποξία, HIF-1α (Hypoxia-induced Factor 1α)

Ο πιο σημαντικός ίσως παράγοντας που επάγει την έναρξη της αγγειογένεσης είναι η υποξία. Η υποξία επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων(54) και την απόπτωση(55) όπως και τη μετάσταση(56). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του οξυγόνου καθορίζει τα επίπεδα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF-1 (hypoxia inducible factor)(57,58).

Ο παράγοντας HIF-1, ένας ετεροδιμερής παράγοντας που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές υπομονάδες, τη HIF-1α και τη HIF-1β, ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που ελέγχουν τη μεταφορά γλυκόζης, τα γλυκολυτικά ένζυμα, τη γλυκονεογένεση, τους αυξητικούς παράγοντες, την ερυθροποίηση, το μεταβολισμό της αίμης, τη μεταφορά του σιδήρου, την αγγειοκινητική ρύθμιση και τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου(59,60) με τις δράσεις αυτές αυξάνεται η επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων κάτω από συνθήκες υποξίας (Εικόνα 7).

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου στα κύτταρα, η πρωτεΐνη HIF-1α αποσυντίθεται συνεχώς μέσω της οδού της ουμικιτίνης. Σε συνθήκες υποξίας εμποδίζεται αυτή η οδός και η πρωτεΐνη σταθεροποιείται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της.(57,61). Αν και δεν είναι ακόμη σαφής ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αντιληπτή από το κύτταρο η έλλειψη οξυγόνου πιστεύεται ότι η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης HIF-1α προκαλείται από μηχανισμούς οξειδοαναγωγής. Συμπερασματικά η ποσότητα της πρωτεΐνης HIF-1α στον πυρήνα φαίνεται ότι καθορίζει τη λειτουργική δράση του συμπλέγματος HIF-1(59).

Ο παράγοντας HIF ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου VEGF που όπως είναι γνωστό αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά μόρια που επάγουν την αγγειογένεση (Εικόνα 9). Άλλα ογκογόνα πεπτίδια που ενεργοποιούνται με τον ίδιο τρόπο είναι η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2)(62), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (platelet derived growth factor,PDGF)(63) και ο ιστικός παράγοντας (tissue factor,TF)(64).



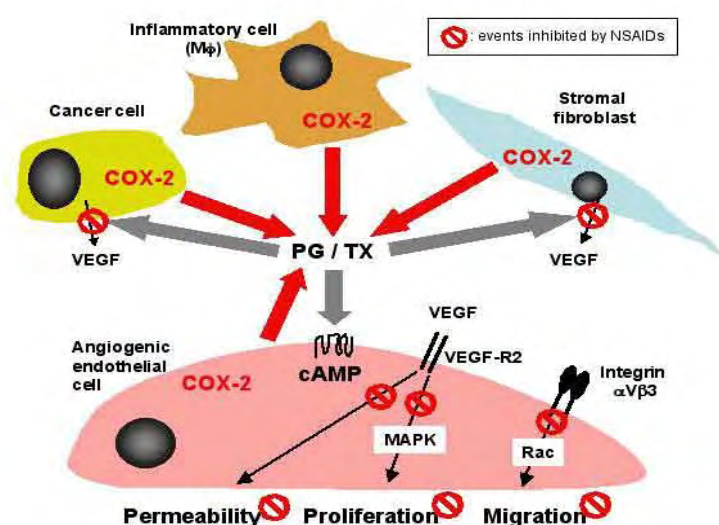
Εικόνα 9. Η υποξία στην αγγειογένεση όγκων

1.9 Κυκλοοξυγενάση, COX (Cyclooxygenase)

Η κυκλοοξυγενάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνες και συμμετέχει σε ποικιλία φυσιολογικών και παθογενετικών μηχανισμών (65). Οι ισομορφές της κυκλοοξυγενάσης, που έχουν μελετηθεί είναι δύο: COX-1 και COX-2 ενώ έχει περιγραφεί και μια τρίτη ισομορφή, η COX-3 (66,67). Η COX-1 χαρακτηρίζεται από την συνεχή έκφραση της στους ιστούς, παράγοντας προσταγλανδίνες (68). Η ενεργή μορφή της COX-2 δεν ανιχνεύεται στους περισσότερους υγιείς ιστούς, αλλά εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε φλεγμονώδεις και νεοπλασματικούς, αφού η έκφραση της επάγεται από προφλεγμονώδεις και μιτογόνους παράγοντες, όπως EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor) και κυτοκίνες (TNF-tumor necrosis factor), Ιντερλευκίνες 1α και 1β (69).

Πρωταγωνιστικό ρόλο παίζει η 5' περιοχή του γονιδίου, όπου αλληλεπιδρούν πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NFκB, ο NF-IL6 (Nuclear factor- interleukin 6) και CRE (C AMP Response Elements). Η υπερέκφραση της COX-2 στα μακροφάγα, στους ινοβλάστες, στους οστεοβλάστες, στα καρκινικά κύτταρα και στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνει την αποδιαφοροποίηση, την ογκογένεση, την αγγειογένεση, τη διήθηση και την μετάσταση (65,70). Επιπλέον, στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου περιλαμβάνονται 6 αντίγραφα της αλληλουχίας ATTTA, που είναι γνωστό ότι επιφέρουν αποσταθεροποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του mRNA(71).

Το ένζυμο COX-2 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 580 αμινοξέων, που περιέχει ενεργό δακτύλιο αίμης. Το ενεργό του κέντρο είναι μεγαλύτερο από αυτό της COX-1, γεγονός που επιτρέπει τη σύνθεση εκλεκτικών αναστολέων της COX-2 (72). Η αυξημένη έκφραση της COX-2 ευνοεί τη δράση του VEGF αλλά και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων και το σχηματισμό τριχοειδικών αγγειακών δομών, ιδιαίτερα σε καρκινώματα παχέος εντέρου και ουροδόχου κύστεως (Εικόνα 10) (73,74). Η μετάλλαξη του γονιδίου που εκφράζει την COX-2, ή εκλεκτική φαρμακολογική αναστολή της, ελαττώνει την παραγωγή του VEGF και την αγγειογένεση. Από τους αναστολείς της COX-2 καλύτερα έχει μελετηθεί η celecoxib που αναστέλλει την παραγωγή του b FGF και την νεοαγγείωση, μέσω της απενεργοποίησης των υποδοχέων των προσταγλανδινών EP2 (75).



Εικόνα 10. Ο πολλαπλός ρόλος της COX-2 στην αγγειογένεση όγκων

1.10 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικου Σαντορίνης στην δυνατότητα πρόκλησης απόπτωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926 με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Ακόμη εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στην έκφραση του αυξητικού παράγοντα του ενδοθηλίου των αγγείων (VEGF) με την ανοσοενζυμική μέθοδο VEGF -ELISA ,του παράγοντα 1α επαγόμενου από υποξία (HIF-1α) και της κυκλοοξυγενάσης-1 (COX-1) με τη μέθοδο Western Blot.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χημικά αντιδραστήρια

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

2.2 Θρεπτικά υλικά

Για την κυτταρική σειρά EAh926 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM low glucose) της εταιρίας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum, FBS) της εταιρίας Biochrom (Μ.Β.) και για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% (Gibco).

2.3 Διαδικασία εκχύλισης

Το εκχύλισμα που εξετάστηκε ήταν από βόστρυχο αμπέλου (*Vitis vinifera*) της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης και απομονώθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος παρατίθεται στον Πίνακα 3.

Η εκχύλιση έγινε ως εξής: τα υπέργεια τμήματα των φυτών αποξηράνθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ποσότητα των τμημάτων φυτών χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v), (αιθανόλη 2/1 v/v) σε ειδική συσκευή αυτόματης εκχύλισης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη διήρκεσε 48 ώρες και επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στη συνέχεια, ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων υπό κενό και κατόπιν η ξηρή ποσότητα των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό για την πραγματοποίηση in vitro δοκιμών.

Πίνακας 3. Πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος

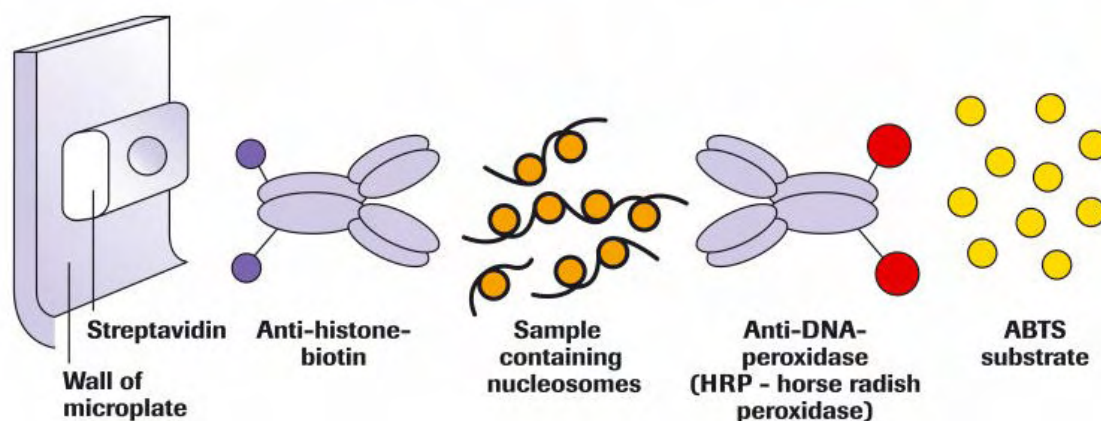
ΚΑΘΑΡΑ ΜΟΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/ml) εκχυλίσματος
Γαλλικό οξύ	1.78
(+)- κατεχίνη	68.85
Trans- ρεσβερατρόλη	5.13
aQ 3-O- rhamnsoside	0.71
Κερκετίνη	0.19
Καφεϊκό οξύ	0.01
p-Κουμαρικό οξύ	0.04
Προκυανιδίνη B3	30,02
Προκυανιδίνη B2	2,48
Trans- καφταρικό οξύ	2,15
ε-βινιφερίνη	8,54
aQ 3-O-galactoside	9,09
aQ 3-O-glycoside	5,15

2.4 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EAhy926

Η κυτταρική σειρά EAhy926 προέρχεται από υβριδισμό ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλίου λώρου (HUVECs) με την A549/8, ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά πνεύμονος. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό DMEM το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι να καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας στο 80%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση τους με 1 ml τρυψίνης 0,25%. Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 3 λεπτά στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5 ml) εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσο το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.5 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από το εκχύλισμα βοστρύχου απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε το kit ‘Cell Death Detection ELISA plus’ της εταιρίας Roche. Τα δείγματα και οι πρότυπες αραιώσεις (standards) ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό των μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων που σχηματίζονται από την διάσπαση του DNA στα αποπτωτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μια ποσοτική ενζυμική ανοσομέθοδος τύπου ‘sandwich’ στην οποία χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού τα οποία συνδέονται με DNA και ιστόνες. Έτσι, είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονο- και ολιγονουκλεοτιδίων στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενός κυτταρολύματος. Δηλαδή, γίνεται λύση των κυττάρων με ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, ακολουθεί απομόνωση του κυτταροπλασματικού κλάσματος του κυτταρολύματος με φυγοκέντρηση και προσθήκη του σε τριβλίο καλυμμένο με στρεπταβιδίνη. Προστίθεται στο τριβλίο αντίσωμα το οποίο συνδέεται με την στρεπταβιδίνη ενώ παράλληλα μπορεί να συνδέεται με τις ιστόνες H1, H2A, H2B, H3 και H4. Στη συνέχεια προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο μπορεί και συνδέεται με δίκλωνα και μονόκλωνα τμήματα DNA. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο περοξειδάση horse radish το οποίο μεταβολίζει την ένωση ABTS σε ένα χρωμογόνο προϊόν που απορροφά στα 405nm (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου ανίχνευσης του κυτταρικού θανάτου – ELISA plus.

Πειραματική διαδικασία

Πειραματικά αιώρημα καρκινικών κυττάρων EAhy926 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε 96-well plate (10.000 κύτταρα/πηγάδι). Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και τα επωάζουμε στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια προσθέτουμε το εκχύλισμα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν είναι 50μg/ml και 100 μg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 16 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, προσθέτουμε 200 μl/πηγάδι ρυθμιστικού διαλύματος για την λύση των κυττάρων και επωάζουμε υπό ανακίνηση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση μεταφέρουμε το κυτταρόλυμα σε σωληνάκια erppendorf του 1ml και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 200Xg για 10 λεπτά.. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 20 μl από το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) και 80 μl/πηγάδι από το ανοσοαντιδραστήριο που περιέχει το 1^ο και το 2^ο αντίσωμα σε 96-well plate όπου κάθε θέση είναι καλυμμένη με στρεπταβιδίνη, και επωάζουμε υπό ανακίνηση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 3 φορές με 300 μl από το παρεχόμενο διάλυμα έκπλυσης. Μετά προσθέτουμε 100 μl/πηγάδι διαλύματος ABTS και επωάζουμε υπό ανακίνηση για 10-20 λεπτά ή μέχρι να εμφανιστεί χρώμα. Στη συνέχεια προστίθεται 100μl/πηγάδι διαλύματος τερματισμού και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm με το λογισμικό Gen5 σε ELISA plate reader (Biotek). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με κυτταρόλυμα από κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε το εκχύλισμα (αρνητικός μάρτυρας) καθώς και δείγματα που περιείχαν το ανοσοαντιδραστήριο με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε διπλά δείγματα.

2.6 Ανοσοενζυμική μέθοδος VEGF - ELISA

Ο προσδιορισμός της αναστολής του VEGF από το εκχύλισμα του βοστρύχου έγινε με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Quantikine[®] Human VEGF Immunoassay kit (DVE00), της εταιρίας R&D Systems, Inc. Τα δείγματα και οι πρότυπες αραιώσεις

(standards) ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος της ELISA βασίζεται στην αρχική ένωση του VEGF με ένα προσδεμένο μονοκλωνικό αντίσωμα και στην επακόλουθη ένωσή του με ένα πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο στο άλλο του άκρο έχει δεσμευμένο ένα ένζυμο. Στο σύμπλοκο αυτό προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου και διεξάγεται η ενζυμική αντίδραση, κατά την οποία εμφανίζεται χρώμα. Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται και μετρείται η ένταση του χρώματος, που είναι ανάλογη της ποσότητας του VEGF που έχει δεσμευτεί στο αντίσωμα. Οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης υπολογίστηκαν, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης των standards που δημιουργήθηκε για κάθε μέτρηση.

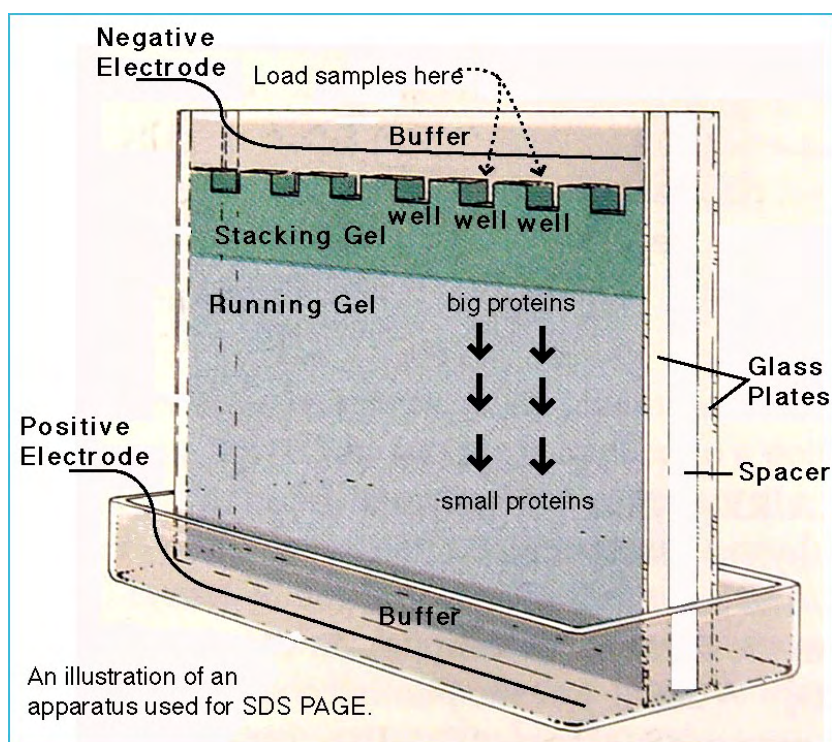
Πειραματική διαδικασία

Πειραματικά, αιώρημα καρκινικών κυττάρων EAhy926 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε 6-well plate (300.000 κύτταρα/πηγάδι). Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και τα επωάζουμε στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια προσθέτουμε το εκχύλισμα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν είναι 50μg/ml και 100 μg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 16 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και το βάζουμε σε eppendorf των 2ml και τα βάζουμε στον πάγο. Έπειτα, πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 15.000 rpm για 30 λεπτά στους 4 °C και αφού ολοκληρωθεί, παίρνουμε 200μl από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 50 μl/πηγάδι ρυθμιστικού διαλύματος και 200 μl/πηγάδι πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων μας. Το kit επωάζεται υπό ανακίνηση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 3 φορές με 400 μl από το παρεχόμενο διάλυμα έκπλυσης. Κατόπιν, προσθέτουμε 200μl/πηγάδι διαλύματος συζεύγματος και το kit επωάζεται υπό ανακίνηση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί απόχυση του διαλύματος και έκπλυση 3 φορές με 400 μl από το παρεχόμενο διάλυμα έκπλυσης και προσθέτουμε 200 μl/πηγάδι διαλύματος χρωμογόνου ενζυμικού υποστρώματος. Η ανάπτυξη του χρώματος γίνεται για 20 λεπτά στο σκοτάδι και η αντίδραση τερματίζεται με τη προσθήκη 50μl/πηγάδι διαλύματος τερματισμού. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm με το λογισμικό Gen5 σε

ELISA plate reader (Biotek). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με κυτταρόλυμα από κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε το εκχύλισμα (αρνητικός μάρτυρας) καθώς και δείγματα που περιείχαν το ανοσοαντιδραστήριο με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε διπλά δείγματα.

2.7 SDS ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (SDS). Το SDS είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS ανά gr πρωτεΐνης). Εξαιτίας του SDS, οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα έχουν φορτιστεί αρνητικά και είναι δυνατή η κίνησή τους όταν βρεθούν εντός ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μέθοδο είναι :

Πηκτή διαχωρισμού (8% ακρυλαμίδα): 4,6ml ddH₂O, 2,7 ml ακρυλαμίδα, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 100μl 10% SDS, 100μl 10% APS και 6 μl TEMED

Πηκτή επιστοίβαξης (8% ακρυλαμίδα): 3ml ddH₂O, 650μl ακρυλαμίδα, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 50μl 10% SDS, 50μl 10% APS και 5 μl TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (10x) (Running Buffer): 30g Tris-Base, 144g γλυκίνη και 10g SDS ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 l

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (1x) (Running Buffer): 100ml Running Buffer (10x), 900 ml ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

Για να απομονώσουμε τις πρωτεΐνες από τα κύτταρα πραγματοποιείται λύση των κυττάρων. Αιώρημα καρκινικών κυττάρων EAhy926 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε τρυβλία Petri. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και τα επωάζουμε στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Για τη μελέτη του HIF-1α προκλήθηκε επαγωγή του στα κύτταρα με προσθήκη 250 μM CoCl₂. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια προσθέτουμε το εκχύλισμα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν είναι 50μg/ml και 100 μg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 16 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και κάνουμε πλύσεις με 2ml PBS και ακολουθεί τρυψινοποίηση. Έπειτα προσθέτουμε 5 ml θρεπτικό υλικό και το μεταφέρουμε σε σωληνάρια falcon των 15 ml και πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση στα 1750 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρούμε το υπερκείμενο και κάνουμε πλύσεις με 5 ml PBS και πραγματοποιούμε πάλι φυγοκέντρηση στα 1750 rpm για 5 λεπτά. Η τελευταία διαδικασία ακολουθείται άλλη μία φορά. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 200 μl Lysis buffer και μεταφέρουμε το διάλυμα σε σωληνάκια eppendorf των 1,5 ml και τα τοποθετούμε στο πάγο. Κατόπιν, κάνουμε sonication (5X(5'' sonication, 20'' break)) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε

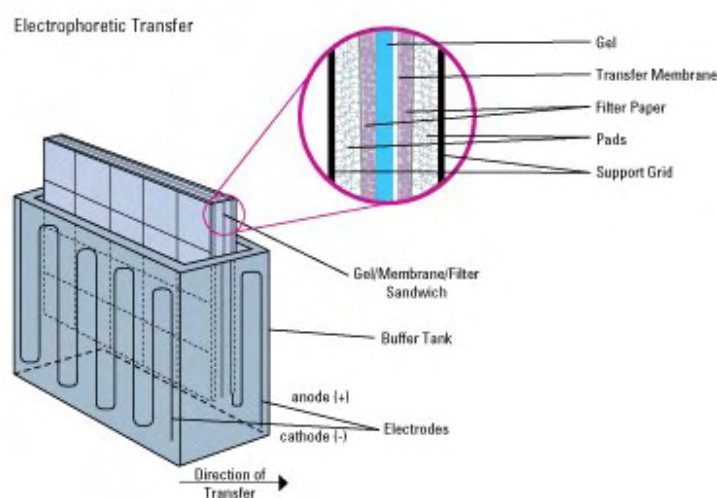
σωληνάκια erpendorf των 1,5 ml και προσδιορίζουμε την συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα με τη μέθοδο Bradford.

Έπειτα ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Αρχικά συναρμολογείται η συσκευή του πηκτώματος, μέσα στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοιβάξης. Στη συνέχεια γίνεται παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού και πραγματοποιείται πολύ καλή και γρήγορη ανάδευση των συστατικών του. Ακολουθεί απόχυση των υγρών ακόμα συστατικών του πηκτώματος διαχωρισμού στην συσκευή και επικάλυψη με απεσταγμένο νερό 1-2 ml. Το υπερκείμενο νερό διευκολύνει τη συμπαγή δομή του πηκτώματος και σταθεροποιεί την επάνω επιφάνειά του. Παρατηρούμε τον πολυμερισμό του πηκτώματος έτσι ώστε να βεβαιωθούμε ότι πραγματοποιείται φυσιολογικά (2-15 λεπτά, ανάλογα με τη σύσταση του πηκτώματος ή /και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος). Απομακρύνεται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος και πριν την παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης. Έπειτα γίνεται παρασκευή του πηκτώματος επιστοιβάξης και πραγματοποιείται πολύ καλή και γρήγορη ανάδευση των συστατικών του. Ακολουθεί απόχυση των υγρών ακόμα συστατικών του πηκτώματος επιστοιβάξης στην συσκευή, πάνω από την επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού. Κατόπιν γίνεται προσθήκη εξαρτήματος (χτενάκι) που χρησιμεύει στη δημιουργία θέσεων προσθήκης του δείγματος στο πηκτώμα επιστοιβάξης. Παρατηρούμε τον πολυμερισμό του πηκτώματος για να βεβαιωθούμε ότι πραγματοποιείται φυσιολογικά (5-15 λεπτά ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος). Στο χρονικό διάστημα όπου αναμένουμε τον πολυμερισμό του πηκτώματος είναι εφικτή η προετοιμασία των δειγμάτων, όπου συνήθως φυλάσσονται στους -20°C . Ακολουθεί θέρμανση των δειγμάτων για 3 λεπτά στους 100°C και φυγοκέντρησή τους για 30'' στα 12.000g και σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση του χρόνου πολυμερισμού του πηκτώματος επιστοιβάξης, απομακρύνεται το εξάρτημα (χτενάκι) και μεταφέρεται η συσκευή του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γίνεται προσθήκη των δειγμάτων των πρωτεϊνών καθώς και ενός δείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Marker) στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος επιστοιβάξης και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου με την εφαρμογή σταθερής τάσης 150V, με αποτέλεσμα τη μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό στο θετικό πόλο του συστήματος. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης, γίνεται τοποθέτηση του

πηκτώματος διαχωρισμού σε κατάλληλη συσκευή, για μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF (Western Blot).

2.8 Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot)

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης – αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί γι' αυτό. Η μέθοδος περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική ανάλυση ενός πρωτεϊνούχου διαλύματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες και τέλος τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων στο αντιγόνο. Μετά από την κάλυψη των κενών θέσεων της μεμβράνης (blocking) πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με ειδικό έναντι του υπό μελέτη αντιγόνου αντίσωμα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή του αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο είτε ενζυμικά είτε ραδιενεργά, οπότε είναι δυνατή η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου αντισώματος μετά από την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μέθοδο είναι:

Ρυθμιστικό διάλυμα για τη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (10x) (Transfer Buffer):
30,3g Tris Base, 144g γλυκίνη, ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 l

Ρυθμιστικό διάλυμα για τη συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (1x) (Transfer Buffer):
100 ml Transfer Buffer (10x), 700ml ddH₂O, 200ml MeOH

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween (10x) (TBS-T): 15,7g Tris-Base, 87g NaCl, 20ml Tween ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 l

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-Tween (1x) (TBS-T): 100ml TBS-T (10x), 900 ml ddH₂O

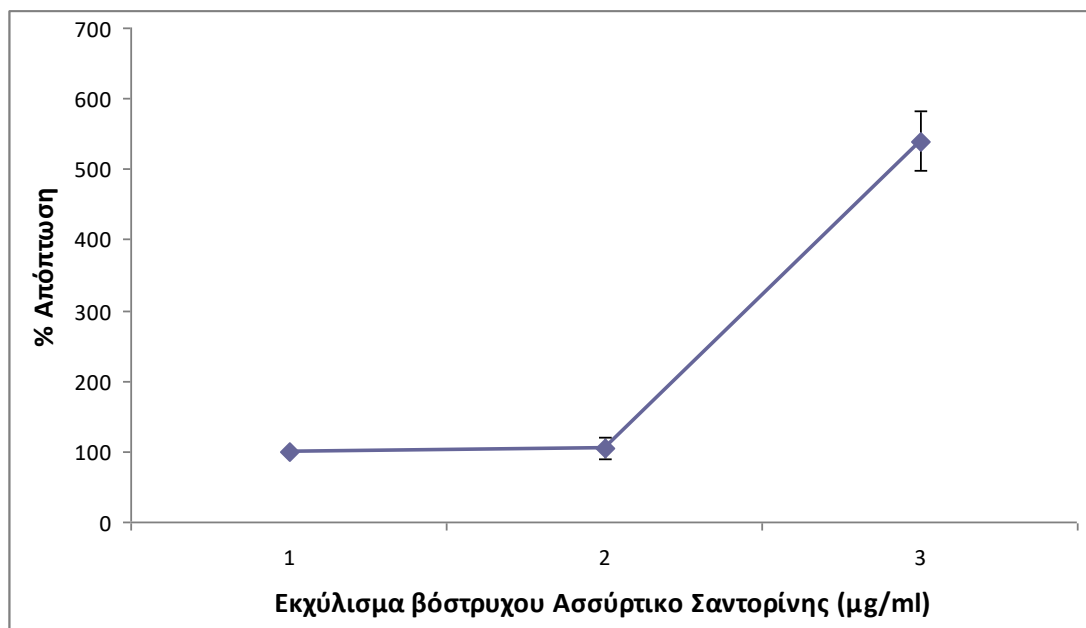
Πειραματική διαδικασία

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ακολουθεί τοποθέτηση του πηκτώματος διαχωρισμού σε κατάλληλη συσκευή, για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF. Η μεταφορά πραγματοποιείται με εφαρμογή ομοιογενούς ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτρομεταφορά). Το πήκτωμα και η μεμβράνη εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (1x) και εφαρμόζεται σταθερή τάση 110 Volt για 2 ώρες, με τέτοιο τρόπο, ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται στο πήκτωμα να μεταφερθούν στη μεμβράνη PVDF. Μετά το τέλος της μεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (1x) με 5% ξηρό γάλα overnight στους 4°C για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (1x) με 5% ξηρό γάλα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση (αραίωση 1/400 για το αντίσωμα COX-1 και 1/500 για το HIF-1α). Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες για το αντίσωμα COX-1 και 1 ώρα για το HIF-1α. Όταν τελειώσει η επώαση γίνεται απόχυση του διαλύματος του πρώτου αντισώματος (το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί) και η μεμβράνη υφίσταται 5 ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η επώαση δευτέρου αντισώματος όπου η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T (1x) με ξηρό γάλα 5% που περιέχει το δεύτερο αντίσωμα (Anti-goat IgG) σε αραίωση 1/2000. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανακίνηση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν τελειώσει η επώαση γίνεται απόχυση του διαλύματος του δευτέρου αντισώματος και η μεμβράνη υφίσταται ξανά 5 ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T (1x) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL για 1 λεπτό και ακολουθεί έκθεση στο φιλμ και εμφάνιση του.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA

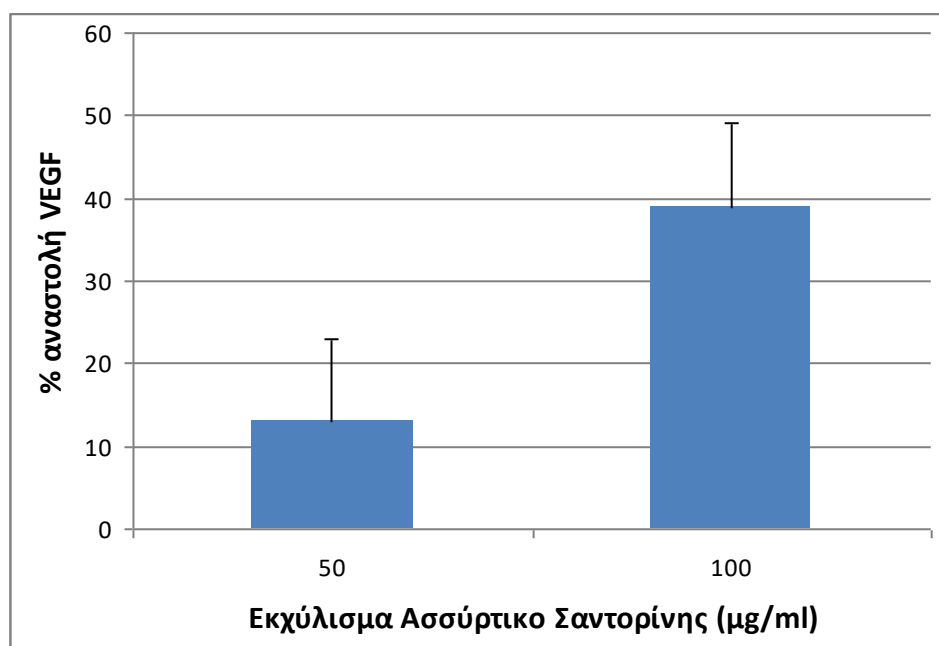
Το εκχύλισμα του βοστρύχου, όπως φαίνεται και στο γράφημα 1, προκάλεσε την απόπτωση των καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων κατά 540% στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$. Αυτό δείχνει ότι η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος του βοστρύχου οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει και στην πρόκληση απόπτωσης. Στην συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g/ml}$ φαίνεται να μην υπάρχει καμία επίδραση του εκχυλίσματος στην πρόκληση απόπτωσης.



Γράφημα 1. Επίδραση του εκχυλίσματος βοστρύχου στην απόπτωση καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων

3.2 Προσδιορισμός της αναστολής του VEGF με την ανοσοενζυμική μέθοδο VEGF - ELISA

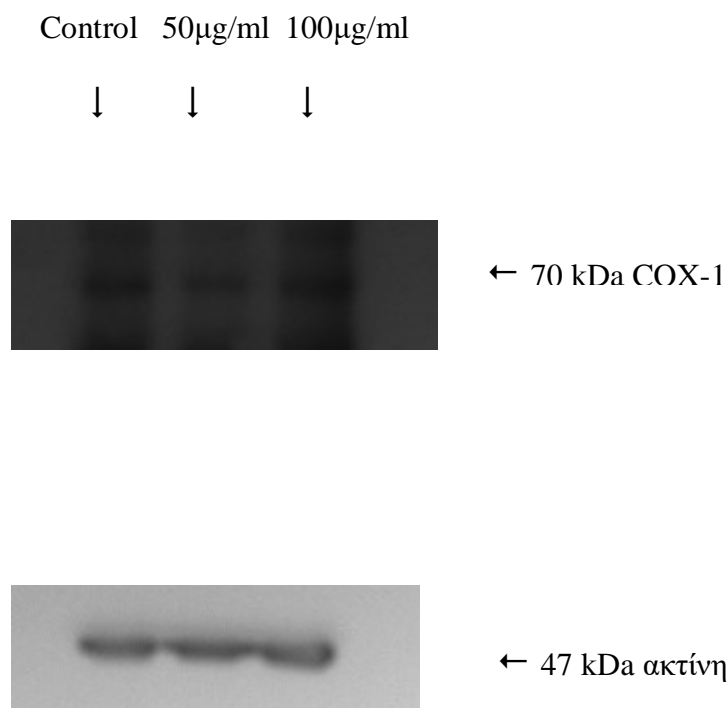
Η αναστολή της έκφρασης του VEGF, από το εκχύλισμα του βοστρύχου, στη συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g/ml}$ είναι 13% ενώ στην συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$ είναι 39% όπως φαίνεται στο γράφημα. Αυτό δείχνει ότι το εκχύλισμα του βοστρύχου μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του VEGF, που θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της αγγειογένεσης, κατά ένα ποσοστό και στις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και ότι πιθανώς στην αναστολή αυτού του παράγοντα οφείλεται τουλάχιστον μερικώς η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος.



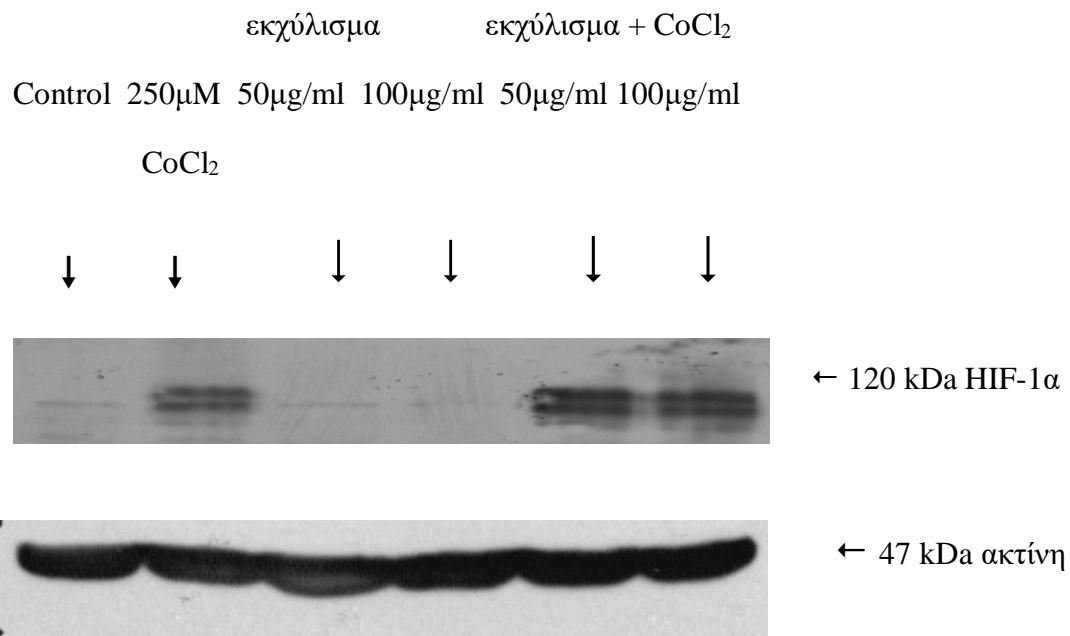
Γράφημα 2. Επίδραση του εκχυλίσματος του βοστρύχου στην έκφραση του VEGF καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων

3.3 Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος του βοστρύχου στους αγγειογενετικούς παράγοντες HIF-1α και COX-1 με τη μέθοδο Western Blot

Όπως φαίνεται στις εικόνες 14 και 15, το εκχύλισμα του βοστρύχου στις συγκεντρώσεις 50μg/ml και 100μg/ml δεν φαίνεται να επιδρά στην έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων HIF-1α και COX-1, αντίστοιχα. Αν και από το προηγούμενο αποτέλεσμα φάνηκε ότι υπάρχει αναστολή του VEGF, το ότι δεν υπάρχει επίδραση σε αυτούς τους παράγοντες δείχνει ότι η αναστολή του VEGF επηρεάζεται από μονοπάτι που δεν εμπλέκονται οι παράγοντες HIF-1α και COX-1.



Εικόνα 14. Επίδραση του εκχυλίσματος του βοστρύχου στην έκφραση της COX-1



Εικόνα 15. Επίδραση του εκχυλίσματος του βοστρύχου στην έκφραση του HIF-1α

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος από βόστρυχο της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης στην απόπτωση καρκινικών κυττάρων και στην έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, COX-1 και HIF-1α. Ο βόστρυχος αποτελεί μέρος των αποβλήτων της οινοποίησης και το μέρος του σταφυλιού στο οποίο δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την πιθανή αντικαρκινική του δράση. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο βόστρυχος του σταφυλιού περιέχει πολυφαινόλες οι οποίες δεν υπάρχουν σε άλλα υποπροϊόντα οινοποίησης όπως, φλαβονόλες, στυλβένια, μονομερείς και πολυμερείς φλαβονόλες(76), ενώ το πολυφαινολικό περιεχόμενο τους υπολογίστηκε γύρω στο 5,8% επί ξηρού βάρους(77).

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση που έχει το εκχύλισμα του βοστρύχου στην απόπτωση των καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 50 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$. Τα αποτελέσματα που πήραμε έδειξαν ότι η συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/ml}$ επάγει την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά περίπου 540%. Οπότε η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος που είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη(78) οφείλεται εν μέρει στην πρόκληση απόπτωσης, η οποία αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση που έχει το εκχύλισμα του βοστρύχου στην έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων VEGF, COX-1 και HIF-1α. Ως αγγειογένεση χαρακτηρίζεται η διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο. Ο σχηματισμός των αγγείων αυτών εξασφαλίζει τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων για την οποία απαιτείται επαρκής τροφοδότησή τους με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά η οποία γίνεται δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων. Η αγγειογενετική δραστηριότητα παρατηρείται φυσιολογικά και είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των ιστών, την επούλωση τραυμάτων και όπως έχει αποδειχθεί παίζει πρωτεύοντα ρόλο σε καταστάσεις φλεγμονής. Όταν η αύξηση των μικροαγγείων είναι μη ελεγχόμενη, η αγγειογένεση είναι παθολογική και εμπλέκεται στην ανάπτυξη μη νεοπλασματικών και, κυρίως, νεοπλασματικών νοσημάτων.

Το 1971 ο Folkman, συνδέοντας το σχηματισμό νέων αγγείων με την ανάπτυξη και τη διηθητική επέκταση του όγκου, διατύπωσε πρώτος τη θεωρία της χρήσης φαρμακευτικών σκευασμάτων που αναστέλλουν την αγγειογένεση, στην καταπολέμηση του καρκίνου(79). Ακολούθησε μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα, η οποία κατέληξε στην αναγνώριση μεγάλου φάσματος αγγειογενετικών παραγόντων, που παράγονται από τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα ή από συρρέοντα στην περιοχή του όγκου κύτταρα του οργανισμού (μακροφάγα, μαστοκύτταρα και λεμφοκύτταρα). Από αυτούς τους παράγοντες ο VEGF φάνηκε ότι παίζει κυρίαρχο ρόλο σε αυτή την διαδικασία(80).

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος του βοστρύχου στην έκφραση του VEGF χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Στις συγκεντρώσεις των 50 μg/ml και των 100 μg/ml που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι υπάρχει αναστολή της έκφρασης του VEGF κατά 13% και 39% αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος βοστρύχου να οφείλεται εν μέρει στην αναστολή του VEGF που θεωρείται ο σημαντικότερος αγγειογενετικός παράγοντας. Αυτή η δράση του εκχυλίσματος πιθανώς να οφείλεται στις πολυφαινόλες που περιέχει. Αρκετές φυσικής προέλευσης πολυφαινόλες έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, με επακόλουθο να παρεμποδίζουν και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων στα ζώα. Μια αντιαγγειογόνο δράση των πολυφαινολών είναι ότι προλαμβάνουν την ενεργοποίηση των εξωκυτταρικών μεταλλοπρωτεϊνών (MMP). Φυσιολογικοί ενεργοποιητές των MMP είναι η θρομβίνη και η πλασμίνη. Μελέτες έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες του κρασιού προλαμβάνουν την ενεργοποίηση των MMP στα λεία μυϊκά κύτταρα., όπου αυτή η δράση σχετίζεται με την ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της θρομβίνης.(81,82). Ο VEGF θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της αγγειογένεσης και έχει παρατηρηθεί ότι, παρά την ποικιλία των αγγειογενετικών παραγόντων, η απενεργοποίηση του και μόνο, αρκεί για την καταστολή της αγγειογένεσης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο VEGF εμπλέκεται σε οδούς ρύθμισης της αγγειογένεσης άλλων αγγειογενετικών παραγόντων όπως π.χ. την επαγωγή έκφρασης του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα από τον bFGF ,μέσω παρακρινών και αυτοκρινών μηχανισμών(83). Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι μελέτες έχουν δείξει ότι ο VEGF έχει αντι-αποπτωτική δράση επάγοντας την

έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα(84) αλλά και συμβάλλοντας στην αναστολή της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης της οδού PI3-Akt (85). Επομένως, η απόπτωση που παρατηρήθηκε από το εκχύλισμα στα EAhy926 κύτταρα μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή του VEGF.

Αφού παρατηρήθηκε αναστολή της έκφρασης του VEGF, το επόμενο βήμα είναι να διερευνηθεί από πιο μονοπάτι οφείλεται αυτή η αναστολή. Ένας παράγοντας που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο παράγοντας 1α επαγόμενος από υποξία, HIF-1α. Ο πιο σημαντικός ίσως παράγοντας που επάγει την έναρξη της αγγειογένεσης είναι η υποξία. Η υποξία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των αυξανόμενων όγκων και των μεταστάσεων που προκαλούν. Η υποξία δημιουργείται ως επί το πλείστον εξαιτίας της μη επαρκούς αιμάτωσης του όγκου και συμβαίνει από τα αρχικά στάδια της αύξησης του όταν η διάμετρος του φτάσει τα λίγα χιλιοστά(86). Αφού η υποξία είναι το κυριότερο ερέθισμα για την επαγωγή του HIF-1α δεν είναι παράξενο που ο HIF-1α βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στα περισσότερα είδη όγκων.

Ένα πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών υποδεικνύει πως ο HIF-1α συμβάλλει θετικά στην εξέλιξη του όγκου και σε επικείμενη μετάστασή του. Ο HIF-1α επάγει μέσω του VEGF την αγγειογένεση στους όγκους, η οποία είναι απαραίτητη για την αιμάτωση τους και την περαιτέρω αύξηση τους(87). Επιπλέον η επαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού από τον HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα του όγκου επιτρέπει την διατήρηση της ενεργειακής ομοιοστασίας τους και την προσαρμογή τους σε υποξικό περιβάλλον(88). Αφού η έκφραση του HIF-1α και η ενεργοποίησή του έχει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου η αναστολή του αποτελεί πιθανό αντικαρκινικό στόχο. Για την μελέτη του HIF-1α έγινε επαγωγή του με προσθήκη στις καλλιέργειες των κυττάρων CoCl_2 και εκχυλίσματος βοστρύχου στις συγκεντρώσεις 50 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος στον HIF-1α ήταν το Western Blot. Τα αποτελέσματα που πήραμε έδειξαν ότι δεν υπήρξε κάποια μεταβολή στην έκφραση του HIF-1α. Αυτό υποδεικνύει ότι η αναστολή στην έκφραση του VEGF οφείλεται σε μηχανισμό όπου δεν εμπλέκεται ο HIF-1α.

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε είναι αυτός της κυκλοοξυγενάσης-1, COX-1. Γενικά, η COX-1 εκφράζεται σταθερά σε πολλούς ιστούς και φαίνεται να σχετίζεται με τις φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, ωστόσο, παρατηρείται αλλαγή της έκφρασής της σε διάφορες καταστάσεις όπως αυτή του καρκίνου. Έτσι, επιθηλιακοί όγκοι των ωοθηκών έχουν βρεθεί να χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα COX-1 απ' ό,τι COX-2(89). Επίσης, παρουσία του ειδικού αναστολέα της COX-1, sc-560, παρατηρείται μείωση της παραγωγής της προστακυκλίνης PGI₂, κυριότερη προσταγλανδίνη που επάγεται από την COX-1, καθώς και σμίκρυνση του όγκου σε ποντίκια που έχουν μολυνθεί με καρκινικά κύτταρα OSE (Ovarian Surface Epithelial cells). Η μείωση του μεγέθους του όγκου είναι αποτέλεσμα της μείωσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αύξησης της απόπτωσης(90). Επίσης, έχει βρεθεί ότι παρουσία αναστολέων των COX-1 και COX-2 ενζύμων οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης του VEGF. Ανταγωνιστές των EP1 και EP4 υποδοχέων επάγουν το ίδιο αποτέλεσμα, πράγμα το οποίο δείχνει τη συμμετοχή της PGE₂(91). Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι πολλές πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν ως παρεμποδιστές της δραστηριότητας των COX, είτε σε μεταφραστικό επίπεδο είτε σε πρωτεϊνικό. Η απιγενίνη, η χρυσίνη και η φλωρετίνη π.χ. έχει βρεθεί ότι καταστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών κι εμποδίζουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η ρεσβερατρόλη, επίσης, φάνηκε να αναστέλλει την έκφραση των COX, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε μεταφραστικό (92).

Η επίδραση του εκχυλίσματος του βόστρυχου στην COX-1 στις συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 100μg/ml έγινε με τη μέθοδο Western Blot. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν να μην υπάρχει κάποια επίδραση του εκχυλίσματος στην COX-1, όπως και στην περίπτωση του HIF-1α. Οπότε, φαίνεται ότι η αναστολή στην έκφραση του VEGF δεν οφείλεται σε μηχανισμό όπου εμπλέκεται η COX-1.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου προκάλεσε απόπτωση σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ακόμη, το εκχύλισμα του βόστρυχου ανέστειλε την έκφραση του VEGF, όπου θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της αγγειογένεσης, μιας διαδικασίας σημαντικής για την ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η αναστολή του VEGF προκαλεί μεταξύ των άλλων και απόπτωση. Άρα, η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην αναστολή του VEGF και στην

πρόκληση απόπτωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το εκχύλισμα όμως δεν βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων HIF-1α και COX-1, που επηρεάζουν την επαγωγή του VEGF. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί σε πιο μοριακό μονοπάτι οφείλεται αυτή η αναστολή του VEGF.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σουφλερός Η. Ε.: Οινολογία επιστήμη και τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη. (2000). Τόμος 1^{ος}
2. Νικολάου Ν. Α.: Αμπελουργία. Θεσσαλονίκη. (2008)
3. Scalbert A & Williamson G.: Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols. J. Nutr. (2000). Vol. 130: 2073S-2085S
4. Morton LW. Caccetta RAA. Puddey IB. Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clin Exper Pharm Phys. (2000). Vol.27: 152-159
5. Manach C. Scalbert A. Morand C. Scalbert A. Remesy C. Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. (2004). Vol. 79: 727-747
6. Cassidy A. Hanley B. Lamuela-Raventos RM. Isoflavones. Lignans and stilbenes origins. Metabolism and potential importance to human health. J Sc Food Agr. (2000). Vol. 80: 1044-1062
7. Guyot S. Marnet N. samoner P. Drilleau JF. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. J Agric Food Chem. (2003). Vol. 51: 6240-3247
8. Rice-Evans C. A. Miller N. J. and Paganda G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine. (1996). Vol.20(7): 900-956
9. Cody V. Middleton E. Harbone J. B. and Beretz A. Plant flavonoids in biology and medicine II-Biological, cellular and medicinal properties. Liss A R. New York. (1998)
10. Igura K. Ohta T. Kuroda Y. Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. Cancer lett. (2001). Vol. 171: 11-16
11. Garbisa S. Biggin S. Cavallarin N. Sartor L. Benelli R. Albini A. Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. Nat. Med. (1999). Vol.5: 1216
12. Lopes GK. Schulman HM. Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. Biochim Biophys Acta. (1999). Vol. 1472: 142-152

13. Shahidi F. & Wanasundara J. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (1992). Vol. 32: 67-103
14. Williams RJ. Spencer JPE. Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine.* (2004). Vol. 36(No7): 838-849
15. Sporn M.B. and Suh N. Chemoprevention of cancer . *Carcinogenesis.* (2000). Vol.21: 525-530
16. William W.N.Jr. Heymach J.V. Kim E.S. and Lippman S.M. Molecular targets for cancer chemoprevention. *Nat Rev Drug Discov.* (2009). Vol.8: 213-225
17. Steinbach G. Lynch P.M. Phillips R.K. Wallace M.H. Hawk E. Gordon G.B. Wakabayashi N. Saunders B. Shen Y. Fujimura T. et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* (2000). Vol. 342: 1946-1952
18. Lippman S.M. and Lee J.J. Reducing the “risk” of chemoprevention: defining and targeting high risk—2005 AACR Cancer Research and Prevention Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* (2006). Vol.66: 2893-2903
19. Hertig A. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey. *Contrib Embryol.* (1935). 25-37
20. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* (1985). Vol. 43: 175-203
21. Ide AG. Baker NH. Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplantas seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol.* (1939). Vol. 42: 891-899
22. Algire GH. Chalkley HW. Legallis FY. et al. Vascular ractions of normal and malignant tissues in vivo. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplant. *J Natl cancer Inst.* (1945). Vol.6: 73-85
23. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* (1997). Vol. 386: 671-674
24. Folkman J. Angiogenesis. *Ann Rev Med.* (2006). Vol.57: 1-18
25. Eberhard A. Kahlert S. Goede v. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* (2000). Vol.60: 1388-1393
26. Liu W. Ahmad S. Reinmuth N. et al. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis.* (2000). Vol. 5: 323-328
27. Hanahan D. Signaling vascular morhogenesis and maintenance. *Science.* (1997). Vol.277: 48-50

28. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. (2005). Vol. 307: 58-62
29. Folkman J. Angiogenesis. In *Biology of Endothelial Cells*. Jaffe EA. (ed) (1984). 412-428
30. Hori K. Suzuki M. Tanda S. et al. In vitro analysis of tumor vascularization in the rat. *Jpn J of Cancer res*. (1990). Vol.81: 279-288
31. Duffy JP. Eibl G. Reber HA et al. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. (2003). Vol.2(1): 12
32. Liekens S. De Clercq E. Neyts J. Angiogenesis : regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. (2001). Vol. 61: 253-270
33. Καψωριτάκη Α. Τιάκα Ε. Μανωλάκης Α. Τσιόπουλος Φ. Καψωριτάκης Α. Ποταμιανός Σ. Αγγειογενετικοί παράγοντες. Ο ρόλος τους στις ΙΦΕΝ. *Info Gastroenterology*. (2009). Τεύχος 42: 20-21
34. Clauss M. Pipp F. Issbrucker K. et al. Dissection of monocyte and endothelial activities by using VEGF-receptor specific ligands. *Adv Exp Med Biol*. (2003). Vol.522: 75-82
35. Neufeld G. Cohen T. Gengrinovitch S. Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. (1999). Vol.13: 9-22
36. Shibuya M. Yamagushi S. Yamane A. et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. (1990). Vol.5: 519-524
37. Dachs GU. Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*. (2000). Vol.36: 1649-1660
38. Guerrin M. Moukadiri H. Chollet P. Moro F. Dutt K. Malecaze F et al. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol*. (1995). Vol.164: 385-394
39. Oberg-Welsh C. Sandler C. Andersson A. Welsh M. Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. (1997). Vol.126: 125-132
40. Sondell M. Lundborg G. Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival

- and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci.* (1999). Vol.19: 5731-5740
41. Alvarez Arroyo MV. Caramelo C. Angeles Castilla M. Gonzalez Pachero FR. Martin O. Arias J. Role of vascular endothelial growth factor in the response to vessel injury. *Kidney International.* (1998). Vol.54: S7-9
 42. Maloney J. Silliman C. Ambruso DR. Wang J. Tudor RM. Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol.* (1998). Vol.275: H1054-H1061
 43. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* (1999). Vol.56: 794-814
 44. Dvorak HF. Brown LF. Detman M. Drovak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol.* (1995). Vol.146: 1029-1039
 45. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *The International J Biochemistry & Cell Biology.* (1998). Vol.30: 1169-1174
 46. Shweiki D. Itin A. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* Vol.359: 843-845
 47. Forsythe J.A. Jiang B.H. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* (1996). Vol.6(9): 4604-4613
 48. Li J. Perrella M.A. et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* (1995). Vol.270(1): 308-312
 49. Goldman C.K. Kim J. et al. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell.* (1993). Vol.4(1): 121-133
 50. Leung D.W. Cachianes G. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* (1989). Vol.246(4935): 1306-1309
 51. Senger D.R. Van de Water L. et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* (1993). Vol. 12(3-4): 303-324
 52. Dvorak H.F. Harvey V.S. et al. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest.* (1987). Vol.57(6): 673-686

53. Ku D.D. Zaleski. J.K. et al. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* (1993). Vol.265(2Pt2): H586-592
54. Carmeliet P. Dor Y. Herbert J.M. Fukumura D. Brusselmans K. Dewerchin M. Role of HIF-1 alpha in hypoxia mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* (1998). Vol.394: 485-490
55. Graeber T.G. Osmanian C. Jacks T. Housman D.E. Koch C.J. Lowe S.W. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* (1996). Vol.379: 88-91
56. Brizel D.M. Scully S.P. Harrelson J.M. Layfield L.J. Bean J.M. Prosnitz L.R. et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* (1996). Vol.56(5): 941-943
57. Huang L.E. Arany Z. Livingston D.M. Bunn H.F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* (1996). Vol.271: 32253-32259
58. Jiang B.H. Semenza G.L. Bauer C. Marti H.H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* (1996). Vol.271: 1172-1180
59. Semenza G.L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (1999). Vol.15: 551-578
60. Ratcliffe P.i. O'Rourke J.F. Maxwell P.H. Pugh C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *Exp Bio.* (1998). Vol.201: 1153-1162
61. Sutler C.H. Laughner E. Semenza G.L. hypoxia-inducible factor 1 alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2000). Vol.97: 4748-4753
62. Schmedtje J.F. jr. Ji Y.S. Liu W.L. DuBois R.N. Runge M.S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* (1997). Vol.272: 601-608
63. Koyrembanas S. Hannan R.L. Faller D.V. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest.* (1990). Vol.86: 670-674

64. O'Rourke J.F. Pugh C.W. Bartlett S.M. Ratcliffe P.J. Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cell using differential-display PCR. Role of hypoxia-inducible factor-1. *Eur J. Biochem.* (1996). Vol.241: 965-976
65. Koki A.T. and Masferrer J.L. Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control.* (2002). Vol.9: 28-35
66. Gilroy D.W. Colville-Nash P.R. Willis D. Chivers J. Paul-Clark M.J. Willoughby D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* (1999). Vol.5: 698-701
67. Willoughby D.A. Moore A.R. Colville-Nash P.R. COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet.* (2000). Vol. 355: 646-648
68. Dannenberg A.J. Altrorki N.K. Boyle J.O. Dang C. Howe L.R. Weksler B.B. Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* (2001). Vol.2: 544-551
69. Diaz A. Chepenik K.P. Korn j. H. Regianto A. M. Jimenez S.A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res.* (1998). Vol. 241: 222-229
70. Araki Y. Okamura S. Hussain S. P. Nagashima M. He. P. Shiseki M. Miura K. Harris C.C. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res.* (2003). Vol.63: 728-734
71. Tanabe T. and Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (2002). Vol.68-69: 95-114
72. Morita I. Schindler M. Regier M.K. Otto J. C. Hori T. DeWitt D.L. Smith W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem.* (1995). Vol. 270: 10902-10908
73. Masferrer J.L. Leahy K.M. Koki A.T. Zweifel b.S. Settle S.L. Woerner B.M. Edwards D.A. Flickinger A.G. Moore R.J. Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* (2000). Vol.60: 1306-1311
74. Williams C.S. Tsujii M. Reese J. Dey S.K. DuBois R.N. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest.* (2000). Vol.105: 1589-1594

75. Cao Y. and Prescott S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol.* (2002). Vol.190: 279-286
76. Makris D. Boskou G. Chiou A. Andrikopoulos. An investigation on factors: affecting recovery of antioxidant phenolics and anthocyanins from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace employing water/ethanol-based solution. *Am J of Food Tech.* (2008). Vol 3: 164-173
77. Makris D. Boskou G. Andrikopoulos N. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Of Food Comp and Anal.* (2007). Vol.20:125-132
78. Κερμελιώτου Ευαγγελία. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλίων στην αύξηση καρκινικών κυττάρων και στην αγγειογένεση. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Λάρισα. (2011)
79. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J med.* (1971). Vol. 285: 1182-1186
80. Bilton R.L. Booker G.W. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochem.* (2003). Vol.270(5): 791-798
81. Dell'Agli M. Busciala A. Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research.* (2004). Vol.63: 593-602
82. Stoclet J.C. Chataigneu T. N'Diaye M. Vascular protection by dietary polyphenols. *Europ J of Pharmacology.* (2004). Vol. 500: 299-313
83. Seghezzi G.S. Patel et al. Fibroblast growth factor-2(FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries : an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* (1998). Vol.141: 1659-1673
84. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* (1992). Vol.3: 65-71
85. Gerber H.P. Dixit V. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antioapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* (1998). Vol.273: 13313-13316
86. Gerber H.P. McMurtrey A. Kowalski J. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* (1998). Vol.273: 30336-30343

87. Zagzag D. Zhong H. Scalzitti J.M. Laughner E. Simons J.W. Semenza G.L.
Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association
with angiogenesis, invasion and progression. *Cancer*. (200). Vol.88: 2606-
2618
88. Aebersold D.M. Burri P. Beer K.T. Laissue J. Djovon V. Greiner R.H. et al.
Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and
prognostic parameter I nthe radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer*
Res. (2001). Vol.20: 1527-1533
89. Daikoku T. Tranguch S. Trofinova I.N. Dinulescu D.M. et al.
Cyclooxygenase-1 is overexpressed in multiple genetically engineered mouse
models of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. (2006). Vol. 66: 2527-2531
90. Lampiasi N. Fodera D. D'Alessandro N. et al. The selective cyclooxygenase-1
inhibitor SC-560 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human
hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*. (2006). Vol.17: 245-252
91. Timoshenko A.V. Chakraborty C. Wanger G.F. Lala P.K. COX-2 mediated
stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer.
Br j Cancer. (2006). Vol. 94: 1154-1163
92. Subbaramaiah K. Chung W.J. Michaluart P. et al. Resveratrol inhibits
cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human
mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. (1998). Vol.273: 2175-2182