



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

*Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΟΣΤΡΥΧΟ
ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**



ΚΕΡΜΕΛΙΩΤΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών στην αύξηση καρκινικών κυττάρων και στην 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.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον λέκτορα κ. Στάγκο Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθεια και προθυμία του να με καθοδηγήσει και να λύσει κάθε απορία μου, 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.

Περίληψη

Ο καρκίνος του ήπατος είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας λόγω του ότι οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία. Έτσι, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του καρκίνου του ήπατος όπως η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η διακοπή ή η αντιστροφή της καρκινογένεσης με τη χορήγηση φυσικών ή συνθετικών χημικών ενώσεων, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα του φυτού άμπελος είναι πλούσια σε φυτικές πολυφαινόλες και παρουσιάζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, αν και έχουν εξεταστεί κυρίως εκχυλίσματα από τους σπόρους και τον καρπό του φυτού δεν έχουν μελετηθεί καθόλου εκχυλίσματα από τους βόστρυχους. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης καθώς και φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται σε αυτό, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2) με τη μέθοδο 'XTT'. Επίσης, εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), η οποία θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας έναντι του καρκίνου, με τη μέθοδο 'Cell death detection Elisa'. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στην δράση των κασπασών 3, 8 και 9 οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση απόπτωσης. Επίσης, εξετάστηκε *in vitro* η επίδραση του εκχυλίσματος στην αγγειογένεση χρησιμοποιώντας την μέθοδο 'Tube formation assay' στα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926. Το εκχύλισμα από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασσύρτικου Σαντορίνης παρουσίασε υψηλή αναστολή της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 ενώ και οι περιεχόμενες πολυφαινόλες, ιδιαίτερος η κερκετίνη και η trans-ρεσβερατρόλη παρουσίασαν υψηλή ανασταλτική δράση ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το εκχύλισμα επάγει την απόπτωση των καρκινικών ηπατικών κυττάρων σε συγκέντρωση 100 µg/ml κατά περίπου 370% αποδεικνύοντας ότι η αναστολή της κυτταρικής αύξησης από το εκχύλισμα οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει σε αυτόν το μηχανισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόπτωση επάγεται από την ενεργοποίηση των κασπασών. Τέλος το εκχύλισμα ανέστειλε το σχηματισμό σωληνίσκων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα συμπεραίνοντας ότι διαθέτει πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση.

Abstract

Primary liver cancer is one of the most frequent tumors, because of the fact that treatments used are not effective. New strategies need to be found, like chemoprevention which is defined as the use of natural or synthetic chemical agents to reverse, suppress or prevent carcinogenic progression to invasion cancer. Several studies have shown that many extracts of vineyard are rich in polyphenolic compounds and exhibit significant antioxidant, antimicrobial, antimutagenic and anticarcinogenic activity. Even though many extracts of seeds and fruits of the plant have been examined, there is no study about grape bostryx extract. The aim of this present work is to investigate the effects of the grape bostryx extract from the Asyrtiko Santorini's variety and its polyphenolic compounds in cancer cell growth using the XTT assay. The ability of the extract to induce apoptosis (programmed cell death), that seems to be an important cancer chemopreventive mechanism, was also examined using the cell death detection ELISA assay. In addition, the effect of the extract in caspases 3, 8, 9 activation was also studied, due to their involvement in apoptotic cell death. Finally, the effect of the extract in angiogenesis was investigated *in vitro* using the "tube formation assay" in endothelial cell line EAhy926. The extract used exhibited high inhibition of human hepatoma cell (HepG2) growth and its polyphenolic compounds revealed high inhibition activity even in low concentrations. Furthermore, the extract induces apoptosis in HepG2 which proves that the inhibition of cell growth is partially attributed to this mechanism. The results showed that apoptosis was induced from the activation of caspases. Eventually, the extract reverted tube formation of human endothelial cells, a fact that indicates that the extract has a potential antiangiogenic effect.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Περιεχόμενα πινάκων	10
Περιεχόμενα εικόνων	11
1. Εισαγωγή	12
1.1. Χημειοπροστασία	12
1.1.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης	12
1.1.2. Χημειοπροφύλαξη	13
1.1.3. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου	14
1.1.4. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου	14
1.1.5. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης	15
1.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις	19
1.2.1. Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών (κρασιού)	19
1.2.2. Σταφύλια – Στέμφυλα – Βόστρυχο	20
1.2.3. Σταφύλια Σαντορίνης	24
1.3. Φυτικές πολυφαινόλες	25
1.3.1. Χημική δομή φυτικών πολυφαινολών	25
1.3.1.1. Φλαβονοειδή	27
1.3.1. Φαινολικά οξέα	28
1.3.1.3. Στιλβένια	29
1.3.1.4. Λιγνάνια	30
1.4. Χημειοπροστατευτικές επιδράσεις των πολυφαινολών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές	31
1.4.1. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των πολυφαινολών	31
1.4.2. Επιδράσεις στην Απόπτωση	33
1.4.3. Επιδράσεις στην Αγγειογένεση	34
1.4.3.1. Αγγειογένεση	34
1.4.3.2. VEGF: Βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης	37
1.4.4. Επίδραση πολυφαινολών στην αγγειογένεση	38

1.5 Σκοπός του πειράματος	40
2. Υλικά και μέθοδοι	41
2.1.Υλικά	41
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	41
2.1.2. Θρεπτικά υλικά	41
2.1.3. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2	41
2.1.4. Εκχύλισμα	42
2.1.5. Διαδικασία εκχύλισης	42
2.2. Μέθοδοι	43
2.2.1. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT	43
2.2.1.1. Αρχή μεθόδου	43
2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία	44
2.2.2. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο Cell Death Detection ELISA.	44
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	44
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	46
2.2.3. Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9	47
2.2.3.1. Αρχή της μεθόδου	47
2.2.3.2. Πειραματική διαδικασία	47
2.2.4. Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EAhy926	48
2.2.5. Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης εκχυλίσματος B10 στην κυτταρική σειρά EAhy926 με τη μέθοδο Trypan blue exclusion assay	48
2.2.6. Προσδιορισμός in vitro της αντι-αγγειογενετικής δράσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα με την μέθοδο σχηματισμού σωληνίσκων (TUBE FORMATION ASSAY)	50
2.2.6.1. Αρχή της μεθόδου	50
2.2.6.2. Πειραματική διαδικασία	51
2.2.6. Στατιστική Ανάλυση	52
3. Αποτελέσματα	53
3.1. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT	53
3.1.1. Εκχύλισμα	53
3.1.2. Φυτικές πολυφαινόλες	53

3.2. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο Cell death detection ELISA plus.	62
3.3. Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9.	62
3.4. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του B10 στην κυτταρική σειρά Eahy926 με τη μέθοδο Trypan blue exclusion assay.	64
3.5 Προσδιορισμός της αντι-αγγειογενετικής δράσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα με τη χρήση BD Matrigel Growth Factor Reduced.	64
4. Συζήτηση	69
5. Βιβλιογραφία	74

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Τυπική (% κατά βάρος) σύσταση λευκών και κόκκινων κρασιών	23
Πίνακας 2: Μερικές διαιτητικές πηγές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων	25
Πίνακας 3: Πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος	41
Πίνακας 4: Περιεκτικότητα των αυξητικών παραγόντων στο υλικό BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced	50

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης	12
Εικόνα 2: Βότρυς σταφυλιού	20
Εικόνα 3: Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού	22
Εικόνα 4: Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών	26
Εικόνα 5: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών	28
Εικόνα 6: Χαρακτηριστική δομή στιλβενίων	29
Εικόνα 7: Χημική δομή φυτικών λιγνανίων και των ζωικών παραγώγων τους.	30
Εικόνα 8: Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση	35
Εικόνα 9: Απεικόνιση σχηματισμού τριχοειδούς αγγείου	37
Εικόνα 10: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των αυξητικών παραγόντων της οικογένειας VEGF με τους υποδοχείς VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3.	39
Εικόνα 11: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό formazan από ζωντανά κύτταρα.	43
Εικόνα 12: Αρχή της μεθόδου ανίχνευσης του κυτταρικού θανάτου – ELISA plus.	45

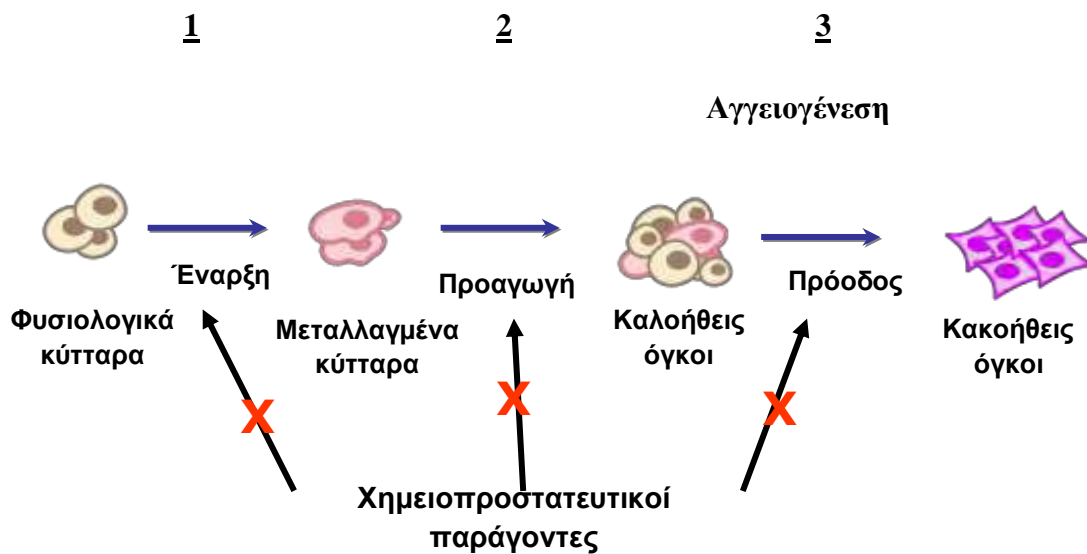
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Χημειοπροστασία

1.1.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης

Η καρκινογένεση περιλαμβάνει τις γενικότερες μεταβολικές διεργασίες, μέσω των οποίων ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό. Η κατανόηση της μεταβολικής αυτής ασθένειας γίνεται ακόμη πιο δύσκολη όταν αντιμετωπίζει κανείς τον καρκίνο σαν ένα φαινόμενο σε επίπεδο οργανισμού, διότι οι παράμετροι που υπεισέρχονται στην περίπτωση αυτή αυξάνονται δραματικά, καθιστώντας την πρόταση ενός μοντέλου εξαιρετικά δύσκολη.

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



Εικόνα 1: Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων

1.Initiation (Εναρξη): Το πρώτο στάδιο διέπεται από την πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγενήτορα (stem cell) (Potter VR,1981). Κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα, προκαλείται μετάλλαξη, δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων (Trosko JE, Chang CC 1989), από ότι κανονικά θα έκανε.

2.Promotion (φάση προαγωγής): ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο αυτό στάδιο είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων (promoters) που προάγουν τη μίτωση (Trosko και συν., 1989), συνεπώς εμφανίζονται οι φαινοτυπικές ανωμαλίες.

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

Συχνά, οι φάσεις της προαγωγής-προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση που ίσως τελικά να είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα.

1.1.2. Χημειοπροφύλαξη

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, μεγάλο ποσοστό των καρκίνων στον άνθρωπο (περίπου 80%) οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, το κάπνισμα και τη διατροφή. Η χημειοπροφύλαξη θεωρείται από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου και σημαίνει την πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας.

Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη χορήγηση χημικών ουσιών (φάρμακα) είτε μέσω των φυσικών συστατικών που προσλαμβάνουμε με τη διατροφή.

Σύμφωνα με τον Wattenberg οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες:

I) αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

II) Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου, οι οποίοι αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης

III) Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική φάση (progression) της καρκινογενετικής διαδικασίας.

1.1.3. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει ουσίες, όπως τα αναγωγικά οξέα, φυτικές πολυφαινόλες (καφεϊκό, γαλλικό οξύ), σουλφυδρυλικές ενώσεις και διάφορα αμινοξέα, όπου συνήθως αναστέλλουν το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον.

1.1.4. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

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

1) *Αναστολείς του κυτοχρώματος P450*: τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, στην οποία ανήκουν και τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μπορεί να μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Έτσι, ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του P450 θεωρείται ότι μπορούν να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.

2) *Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών*: οι ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II δρουν κυρίως ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Σημαντικά ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών είναι η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η τρανσφεράση του UDP γλυκουρονικού.

3) *Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών*: οι βλάβες στο DNA των κυττάρων προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονιοφιλικών 'τελικών' καρκινογόνων ή των διαφόρων ελευθέρων ριζών με το DNA. Η εξουδετέρωσή τους αποτελεί βασικό μηχανισμό της χημειοπροφυλακτικής δράσης αρκετών ουσιών.

4) *Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA*: πρόκειται για ένζυμα ή και φυσικές ουσίες που αυξάνουν την ικανότητα της αποκατάστασης των βλαβών του DNA ή εμπλέκονται στους μηχανισμούς αποκατάστασης.

1.1.5. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Οι παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης όπως προτάθηκε από τους Morse και Stoner, Deflora και Ramel και τους Kellof και τους συνεργάτες ταξινομούνται σε:

1) *αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών*: η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με την συγκέντρωση των πολυαμινών που είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Διάφοροι παράγοντες φαίνεται να δρουν ως αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών.

2) *Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης*: αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποκατάσταση της ικανότητας των κυττάρων να διαφοροποιούνται μπορεί να καταστείλει την καρκινογένεση. Γνωστό παράδειγμα αποτελεί η βιταμίνη Α.

3) *Ρυθμιστές της 'οδού μετάδοσης μηνύματος'*: τα πολλαπλά μόρια της οδού μετάδοσης του μηνύματος μπορούν να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης, αποκαθιστώντας τη φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

4) *Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων*: οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν άμεσα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω ρύθμισης της επαγωγής ή της δραστηριότητας ειδικών ορμονών ή αυξητικών παραγόντων.

5) *αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων*: οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν την ικανότητα των χημειοπροφυλακτικών ουσιών να αναστέλλουν τη δράση των ογκογονιδίων, εστιάζονται στο ογκογονίδιο ras. Για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη ras πρέπει πρώτα να υποστεί φαρνεσυλίωση. Έχει βρεθεί λοιπόν ότι η ουσία D-limonene που βρίσκεται στα κίτρα, αναστέλλει την φαρνεσυλίωση των G-πρωτεϊνών και αναστέλλει τη φάση προόδου των όγκων του μαστού, σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκε MNU ή DMBA.

6) *Επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας* : οι χασμοσύνδεσμοι (gap junctions) είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω των οποίων τα κύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά κύτταρα. Η επικοινωνία αυτή αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και έχει αποδειχθεί ότι στην καρκινογενετική διαδικασία αναστέλλεται αυτή η επικοινωνία. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα η βιταμίνη Α, προάγουν την επικοινωνία των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων, αναστέλλοντας την καρκινική μεταμόρφωση.

7) *Αποκατάσταση της ανοσολογικής απάντησης*: Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απάντηση, μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως για παράδειγμα το ρετινοϊκό οξύ αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killers,NK).

8) *Επαγωγείς της απόπτωσης* : Η απόπτωση ορίζεται ως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και διαδραματίζει ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και ανάπτυξη των ιστών σε έναν οργανισμό. Διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής αύξησης και του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου οδηγεί σε σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος.

Το γεγονός – εκκινήτης για την απόπτωση μπορεί να είναι μια κυτταρική βλάβη ή εξωτερικά σήματα, όπως χαμηλά επίπεδα αναστολέων απόπτωσης. Συνεπάγεται ότι αν διαπιστωθεί βλάβη στο DNA είτε πρέπει να επιδιορθωθεί άμεσα ή να απομακρυνθεί το εν λόγω κύτταρο, ώστε να μη μεταφερθεί η γενετική βλάβη στις επόμενες γενιές και έτσι ξεκινά η διαδικασία της απόπτωσης.

Κατά την απόπτωση παρατηρείται μια σειρά μορφολογικών αλλαγών, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου που εντείνει τη δράση ενδονουκλεασών, οι οποίες υδρολύουν το DNA, η συμπύκνωση του πυρήνα καθώς και η συμπύκνωση των συστατικών του κυτταροπλάσματος. Η εμφάνιση κυστών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη συνδέεται με τη δράση των καλπαϊνών, μιας ομάδας ασβεστοεξαρτώμενων ενζύμων, οι οποίες διασπούν τις πρωτεΐνες πρόσφυσης των μικρονηματίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι κασπάσες, μια άλλη ομάδα πρωτεασών, εμπλέκονται επίσης στη διαδικασία της απόπτωσης ενώ παρατηρούνται ακόμη μεταβολές στις πρωτεϊνικές κινάσες και αύξηση της σύνθεσης του TGF-β με αποτέλεσμα την παύση της κυτταρικής διαίρεσης.

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

Ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ουσίες εμφανίζουν μεταξύ άλλων και δράση επαγωγέων της απόπτωσης. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση. Από τα στοιχεία αυτά συμπεραίνουμε ότι η επαγωγή της απόπτωσης μπορεί να αναστείλει την καρκινογένεση.

9) *Επιδιορθωτές της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA* : Έχει αποδειχθεί ότι η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν σαν δότες μεθυλομάδων.

10) *Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης* : τα καρκινικά κύτταρα παράγουν διάφορα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη λύση της βασικής μεμβράνης, με συνέπεια τη διήθηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Τέτοια ένζυμα είναι οι πρωτεάσες κολλαγενάση, υαλουρονιδάση, καθεψίνη D, ελαστάση και ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Έτσι, η χημειοπροφυλακτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών τουλάχιστον εν μέρει, οφείλεται στην αναστολή της λύσης της βασικής μεμβράνης.

11) *Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος* : Ανάμεσα στα πολλά γεγονότα που συμβαίνουν κατά την προαγωγική φάση της πειραματικά προκαλούμενης καρκινογένεσης, είναι η αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, που συμμετέχει στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση. Το σύστημα της κυκλοοξυγενάσης μετατρέπει το αραχιδονικό σε προστακυκλίνες, προσταγλαδίνες και θρομβοξάνια, ενώ το σύστημα της λιποοξυγενάσης μετατρέπει το αραχιδονικό σε λευκοτριένια και σε υδροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας δημιουργούνται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ασπιρίνη, πιροξικάμη) και μερικές αντιοξειδωτικές ουσίες (φλαβονοειδή), είναι δραστικοί αναστολείς της καρκινογένεσης. Οι αναστολείς της λιποοξυγενάσης, όπως η βιταμίνη E,

που είναι και δότες ηλεκτρονίων αναστέλλουν την δημιουργία ασταθών ελευθέρων ριζών και την προαγωγική φάση της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών.

1.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις

ΓΕΝΙΚΑ

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

1.2.1 Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών (κρασιού)

Η άμπελος είναι ένα από τα φυτά του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο προϊόν του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis vinifera* από το οποίο προέρχεται και το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών (Soleas και συν., 1997). Το *Vitis vinifera* πιστεύεται ότι είναι ένα από τα πρώτα φυτά που άρχισε να καλλιεργεί ο άνθρωπος και υπάρχουν ιστορικές αποδείξεις που δείχνουν ότι η συστηματική καλλιέργειά του ξεκίνησε πριν από περίπου 6.000 χρόνια (Soleas και συν., 1997). Από την αρχαιότητα ακόμα τα σταφύλια και το κρασί είχαν χρησιμοποιηθεί σε κοινωνικο-θηρσκευτικές εκδηλώσεις καθώς και για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών και του κρασιού. Η προστασία των σταφυλιών και του κρασιού έναντι των καρδιακών παθήσεων πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντι-αθηρωματική δράση τους βελτιώνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Chou και συν., 2001), αυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και προστατεύοντας έτσι από οξείδωση τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Day και συν., 1997), και ελαττώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Keevil και συν., 2000). Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού ίσως συνδέεται με προστασία από κάποιες μορφές καρκίνου (Boffetta και Garfinkel 1990; Renaud και συν., 1998). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν

προταθεί για την αντικαρκινική δράση των σταφυλιών και του κρασιού όπως η διακοπή της κυτταρικής αύξησης μέσω τροποποίησης βιοχημικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο καθώς και της δράσης διαφόρων κινασών, η επαγωγή της κυτταρικής διαφοροποίησης (Agarwal και συν., 2000β; Bagchi και συν., 2002), η αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX-1 και COX-2) (Waffo-Teguo και συν., 2001) και η αναστολή της αγγειογένεσης (Singh και συν., 2004). Ωστόσο, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των σταφυλιών δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί και η μελέτη τους θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική (De Flora και συν., 2001). Άλλες βιολογικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών είναι αντιοξειδωτικές (Bagchi και συν., 2000), αντιμικροβιακές (Weisse και συν., 1995), δράση κατά του έλκους (Saito και συν., 1998) και αντιυπερτασικές (Soares De Moura και συν., 2002)

1.2.2. Σταφύλια – Στέμφυλα – Βόστρυχο

Το σταφύλι, ως πρώτη ύλη στην παραγωγή οίνου, ασκεί σπουδαία επίδραση στον τύπο και την ποιότητα αυτού. Ο βότρυς του σταφυλιού απαρτίζεται από δύο κύρια μέρη (Εικόνα 2)

- το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχος ή τσαμπί και
- τις ράγες, που αποτελούν το εδάδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού.



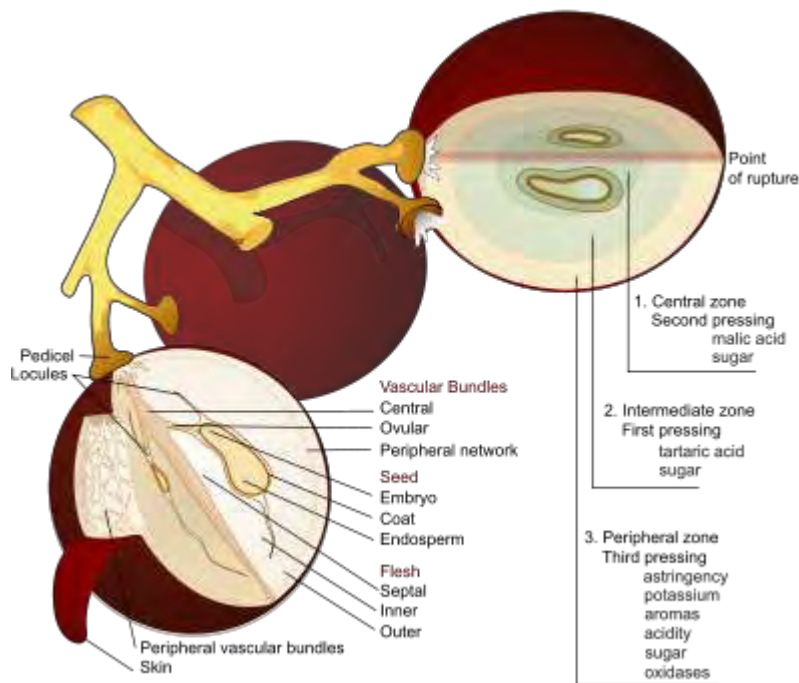
Εικόνα 2: Βότρυς σταφυλιού.

Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των πρεμνών, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βότρου. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχος, σε σχέση με το σύνολο των ραγών. Κατά μέσο όρο πάντως, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

- βόστρυχος 3-7% κατά βάρος και 30% κατ' όγκο
- ράγες 93 -97% κατά βάρος και 70% κατ' όγκο

Το συστατικό που περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο βόστρυχα είναι το νερό, το οποίο αρχικά μπορεί να φτάσει μέχρι και 90% κατά βάρος. Στη συνέχεια και ανάλογα με το βαθμό ξυλοποίησης των ιστών του ή ξήρανσης του, το νερό περιορίζεται στο 65-75%. Η μείωση του νερού στο βόστρυχα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ξηρής ουσίας αυτού, η οποία από 10 % μπορεί να φτάσει στο 25-35 % κατά βάρος ή σε μεγαλύτερα ακόμη ποσοστά σε μερικές περιπτώσεις. Το μεγαλύτερο μέρος της ξηρής ουσίας αποτελείται από τις ξυλώδεις ουσίες, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει κυρίως ταννίνες (2-4 % κατά βάρος).

Η ράγα αποτελείται από το φλοιό, το σαρκώδες μέρος ή σάρκα και τα γίγαρτα με την ακόλουθη εκατοστιαία σύνθεση κατά βάρος: Φλοιός 10-20%, σάρκα 74-87%, γίγαρτα 3-6%. Τα τελευταία σε μερικές περιπτώσεις λείπουν ολότελα. Τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται ανάλογα με τη ποικιλία του σταφυλιού, τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες και το βαθμό ωρίμανσης. Η ανατομία (Εικόνα 3) και η σύσταση του καθενός από τα μέρη της ράγας παρουσιάζονται παρακάτω (Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 3 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera L.*), όπως ήδη ειπώθηκε, περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις πολυφαινόλων και ιδιαίτερα φλαβονοειδών. Η ποσότητα και η σύνθεση των βιολογικά ενεργών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια και τα προϊόντα τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, την ωριμότητα, της συνθήκες της εποχής, την περιοχή παραγωγής και την απόδοση του φρούτου. Οι κυριότερες πολυφαινόλες του σταφυλιού είναι οι ανθοκυανίνες και οι φλαβανόλες στα κόκκινα και στα λευκά αντίστοιχα. Γενικά τα κόκκινα σταφύλια περιέχουν περισσότερες πολυφαινόλες σε σχέση με τα λευκά. Τα γίγαρτα και ο φλοιός τους είναι επίσης μια σημαντική πηγή φλαβονοειδών και συγκεκριμένα τα γίγαρτα περιέχουν αξιόλογες ποσότητες προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες. Η σύσταση των γιγάρτων είναι πολύ περισσότερο μεταβλητή από την αντίστοιχη του φλοιού (Girar και συν, 1998).

Το πιο διαδεδομένο εμπορικό παράγωγο του σταφυλιού είναι το κρασί. Η διαδικασία οиноποίησης μετασχηματίζει τις υπάρχουσες στο σταφύλι πολυφαινόλες και ως αποτέλεσμα οι κύριες πολυφαινόλες στο κρασί να είναι οι φλαβανόλες, οι φλαβανοδιόλες, οι ανθοκυανίνες και οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες και η εξαιρετικά βιολογικά ενεργή ρεσβερατρόλη της οποίας η συγκέντρωση κυμαίνεται από 1.5 έως 3 mg/l (Girar και συν, 1998; Shahidi, 2004). Δεδομένου το φαινολικό περιεχόμενο στην πρώτη ύλη, τα κόκκινα κρασιά επιδεικνύουν και μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με αντίστοιχο των λευκών (Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Τυπική (% κατά βάρος) σύσταση λευκών και κόκκινων κρασιών.

Component	Table wines		Dessert wines	
	White	Red	White	Red
Water (by difference)	87	87	76	74
Ethanol	10	10	14	14
Other volatiles	0.04	0.04	0.05	0.05
Extract	2.6	2.7	10.1	12.2
Sugars	0.05	0.05	8	10
Pectins	0.3	0.3	0.25	0.25
Glycerol	1.1	1.1	0.9	0.9
Acids	0.7	0.6	0.5	0.05
Ash	0.2	0.2	0.2	0.2
Phenols ^b	0.01	0.2	0.01	0.1
Amino acids	0.25	0.25	0.2	0.2
Fats, terpenoids	0.01	0.02	0.01	0.02
Vitamins, etc.	0.01	0.01	0.01	0.01
Total:	100	100	100	100

^a Singleton (93)

^b Εκτός από το περιεχόμενο σε ζάχαρη, το φαινολικό περιεχόμενο είναι η μόνη ουσιαστική διαφορά των λευκών και κόκκινων κρασιών και των δυο μεγάλων κατηγοριών του πίνακα.

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά και στην ποιότητα των κόκκινων κρασιών ενώ η συγκέντρωσή τους στο λευκό κρασί είναι πολύ χαμηλότερη. Οι φαινόλες και οι παρόμοιες τους ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση, την γεύση, την αίσθηση στη γλώσσα και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του κρασιού.

Το ποσό των φλαβονοειδών, που εξάγεται κατά την οινοποίηση, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία, το χρόνο επαφής του φλοιού, την ανάμειξη, τον τύπο της δεξαμενής ζύμωσης, τη σύσταση σε αιθανόλη, το SO₂, το pH και τα πεκτολυτικά ένζυμα (G.Soleas και συν, 1997)

1.2.3. Σταφύλια Σαντορίνης

Το έδαφος του νησιού της Σαντορίνης αποτελείται από ασβεστόλιθο και σχιστόλιθο, οι οποίοι από τις διαδοχικές ηφαιστειογενείς εκρήξεις σκεπάστηκαν από σκουριά, στάχτη, λάβα και ελαφρόπετρα. Τα φτωχά αυτά υλικά αποτέλεσαν το έδαφος, όπου γεννήθηκαν οι εξαιρετικοί οίνοι 'Σαντορίνης' ανώτερης ποιότητας.

Εκτός από το έδαφος, ιδιαιτερότητες παρουσιάζουν, επίσης, και οι κλιματολογικές συνθήκες του νησιού. Κατά την εποχή της ωρίμανσης των σταφυλιών, στη Σαντορίνη επικρατούν υψηλές ημερήσιες θερμοκρασίες και πυκνή νυκτερινή υγρασία. Η υγρασία αυτή, όμως με το φύσημα των ανέμων δεν συγκεντρώνεται πάνω στα σταφύλια, παρά μόνο στο απορροφητικό έδαφος του αμπελώνα. Οι συνθήκες αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα να ευνοούν μια ολοκληρωμένη ή ακόμη και προχωρημένη ωρίμανση των σταφυλιών, χωρίς ωστόσο να επιδρούν στην αποσύνθεση των όξινων συστατικών του σταφυλιού.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες παράγονται οίνοι με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη (μέχρι και 17 %) και οξύτητας σχεδόν ίσης με εκείνους της Β. Ελλάδας.

Οι λευκοί οίνοι της Σαντορίνης παράγονται από σταφύλια των λευκών ποικιλιών Ασύρτικο, Αηδάνι και Αθήρι ενώ οι ερυθροί οίνοι από την ποικιλία Μανδηλαριά. Οι τελευταίοι χρησιμοποιούνται είτε για αναμίξεις είτε για απευθείας κατανάλωση (Σουφλερός, 2000).

1.3. Φυτικές πολυφαινόλες

1.3.1. Χημική δομή φυτικών πολυφαινολών

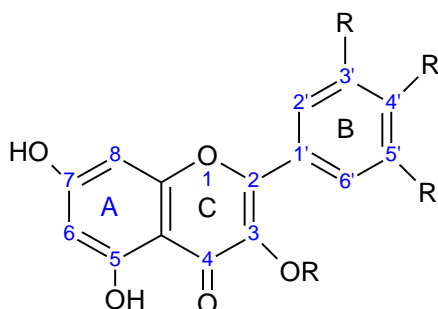
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Στο φυτικό βασίλειο έχουν ταυτοποιηθεί πολλές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή και συγκεκριμένα πάνω από 8000 φαινολικές δομές είναι γνωστές μέχρι σήμερα (Bravo, 1998). Οι πολυφαινόλες, που αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert και συν, 2000). Οι πολυφαινόλες είναι ουσίες ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο (Morton και συν, 2000) (Πίνακας 2). 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 κυριότερες κατηγορίες πολυφαινολών είναι: τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι λιγνάνες.

Πίνακας 2 : Μερικές διαιτητικές πηγές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων

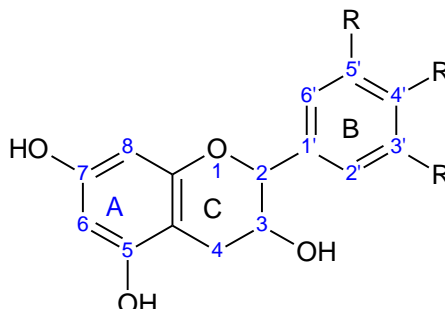
	Βιοδραστικά στοιχεία
Κατεχίνες	Τσάι, Κόκκινο κρασί
Φλαβονοειδή	Εσπεριδοειδή
Φλαβονόλες	Κρεμμύδια, Ελιές, Τσάι, Μήλα
Ανθοκυανιδίνες	Κεράσια, Φράουλες, Σταφύλια, Φρούτα με χρώμα
Καφεϊκό οξύ	Σταφύλια, Κρασί, Ελιές, Καφές, Μήλα, Τομάτες, Δαμάσκηνα, Κεράσια

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

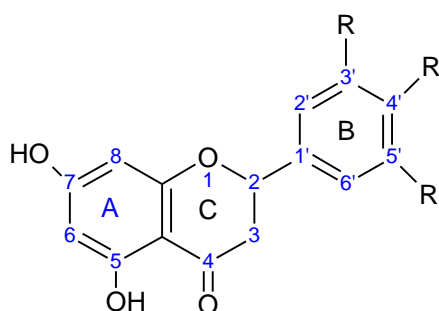
Φλαβονόλες



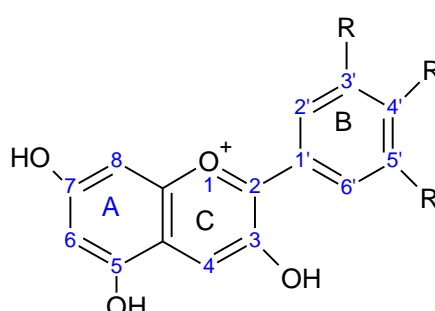
Φλαβανόλες



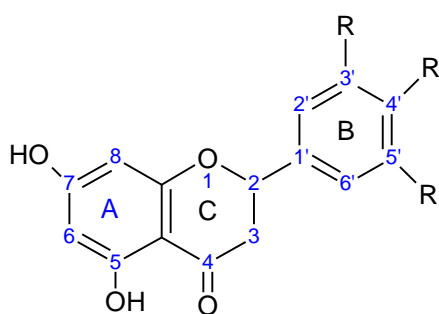
Φλαβόνες



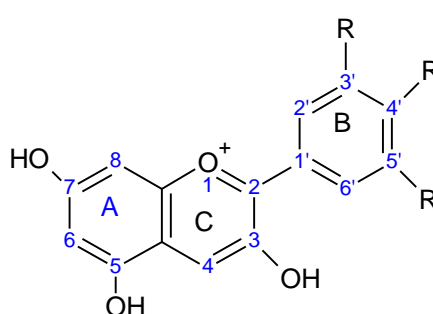
Ισοφλαβόνες



Φλαβανόνες



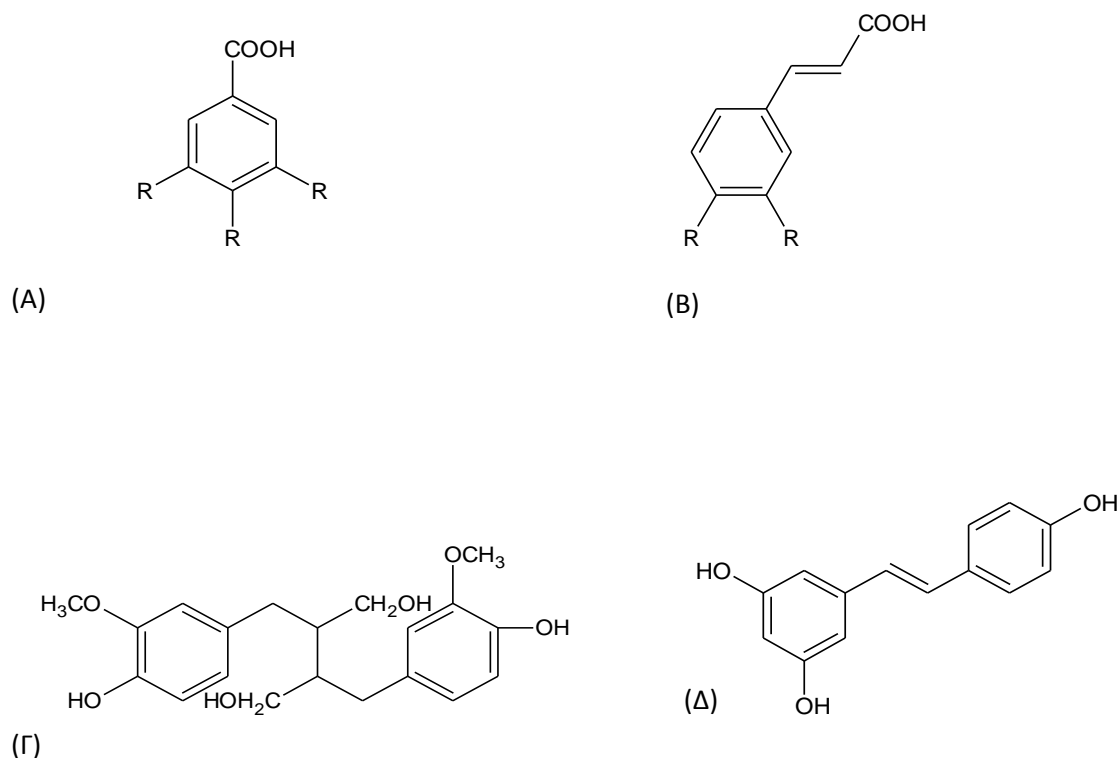
Ανθοκυανιδίνες



Εικόνα 4: Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

1.3.1.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινόλων, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη. Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.



Εικόνα 5: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στυλβενίων και λιγνανών. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοΐσολαρισρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στυλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

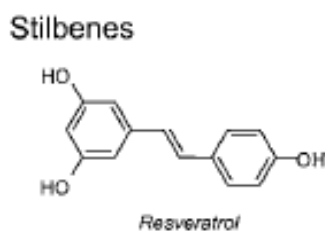
1.3.1.2. Φαινολικά οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος (εικόνα 5). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερούλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουνικό οξύ, το σικιμικό οξύ και

το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουνικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford, 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκιναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur και συν., 1997). Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

1.3.1.3. Στιλβένια

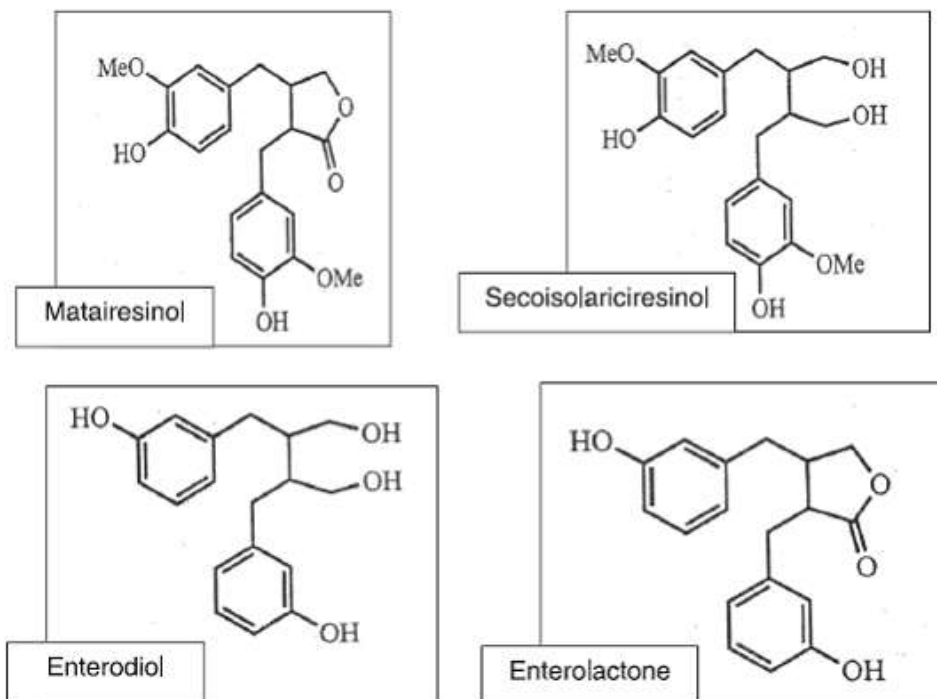
Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας (εικόνα 6). Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli και συν., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση (Bhat και Pezzuto 2002). Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται .



Εικόνα 6 : Χαρακτηριστική δομή στιλβενίων.

1.3.1.4. Λιγνάνια

Τα λιγνάνια συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται σε διάφορες ουσίες που είναι γνωστές για την δράση τους ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Τα λιγνάνια σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες (εικόνα 7). η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ άλλα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες τους (Adlercreutz και Mazur 1997).



Εικόνα 7: Χημική δομή φυτικών λιγνάνων και των ζωικών παραγώγων τους.

1.4. Χημειοπροστατευτικές επιδράσεις των πολυφαινολών σε καρκινικές κυτταρικές σειρές

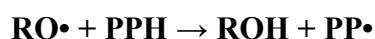
Οι πολυφαινόλες είναι συνεπώς μια από τις πολυπληθέστερες και ευρύτατα διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής, τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων. Πολλές μελέτες σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ζωικά μοντέλα καθώς και επιδημιολογικές μελέτες καταλήγουν σε ένα προστατευτικό ρόλο των πολυφαινολών ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνων (Morton LW και συν., 2000), ενώ οι επιδράσεις τους πιθανόν εξαρτώνται από τον ιστικό ή και κυτταρικό τύπο που εφαρμόζονται καθώς και από την υψηλή ή χαμηλή δόση που χορηγούνται στα πειράματα.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και των χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων τους στην ανθρώπινη υγεία. (Dew και συν., 2005).

1.4.1. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των πολυφαινολών

Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα μπορούν να δράσουν σαν αντιοξειδωτικά με έναν αριθμό δυνατών μηχανισμών. Ο πιο σημαντικός από αυτούς είναι πιθανότατα μέσω της εξουδετέρωσης της ρίζας, κατά την οποία η πολυφαινόλη, διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών. Επιπλέον, ορισμένες πολυφαινόλες μπορεί να επάγουν ένζυμα με αποτέλεσμα να αυξηθεί η απέκκριση οξειδωτικών παραγόντων από τον οργανισμό, ή να αναστέλλουν ένζυμα, που έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, ή να προστατεύουν άλλα αντιοξειδωτικά, όπως τη γλουταθειόνη, τη βιταμίνη E, το β-καροτένιο και το λυκοπένιο από την οξείδωση.

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση διακόπτουν την αλυσιδωτή αντίδραση των ελευθέρων ριζών και δεσμεύουν μέταλλα τα οποία καταλύουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως π.χ. το ταννικό οξύ δημιουργεί σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου και έτσι παρεμποδίζει τη σύνθεση ριζών υδροξυλίου από την αντίδραση Fenton (Lopes και συν., 1999). Οι πολυφαινόλες δρουν κυρίως ως δότες κατιόντων H στις ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδραση:

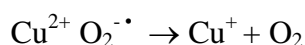
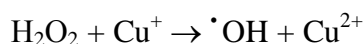


όπου η πολυφαινόλη μετατρέπεται σε μια νέα ρίζα PP•, η οποία όμως είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο και δύσκολα επιτρέπει μία νέα αλυσιδωτή αντίδραση. Η ρίζα αυτή σταθεροποιείται με διασπορά των μη συζευγμένων ηλεκτρονίων γύρω από τον αρωματικό δακτύλιο κατά το φαινόμενο του συντονισμού (Shahidi & Wanasundara, 1992).

Επίσης μπορεί να σταματήσει την αλυσιδωτή αντίδραση των ριζών αντιδρώντας με άλλες ρίζες όπως την παρακάτω αντίδραση:



Ένας άλλος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών, ειδικά σε συστήματα που υπάρχουν μεταλλικά ιόντα, όπως ο χαλκός και ο σίδηρος είναι η δημιουργία χηλικών ενώσεων με τα μέταλλα. Η συμπλοκοποίηση των καταλυτικών αυτών μεταλλικών ιόντων, ίσως προστατεύει από την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ισχυρά δραστικών υδροξυλο- ριζών, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Halliwell και συν., 1995).



Έτσι για παράδειγμα, οι Manach και συν (1998) βρήκαν, ότι ορισμένα συζευγμένα μόρια της κερκετίνης έχουν την ικανότητα να μειώνουν την οξείδωση της LDL από μόρια χαλκού.

Ωστόσο, η ικανότητα των πολυφαινολών να αντιδρούν με μεταλλικά ιόντα, τα καθιστά σε ορισμένες περιπτώσεις προ-οξειδωτικά. Προφανώς τα φλαβονοειδή, μπορούν να ανάγουν τον Cu^{2+} σε Cu^+ και να επιτρέψουν τον περαιτέρω σχηματισμό ανεξάρτητων ριζών. Το καφεϊκό οξύ φαίνεται επίσης να έχει μία προοξειδωτική δράση στο Cu^{2+} ο οποίος οδηγεί σε οξείδωση της LDL (Yamanaka και συν., 1997).

Πρέπει να σημειωθεί, ότι αυτή η προοξειδωτική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί μόνο στην φάση της προαγωγής και όχι στην φάση έναρξης κατά την οποία το καφεϊκό οξύ αναστέλλει την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης, όπως έχει εξακριβωθεί σε προηγούμενες μελέτες (Laranjinha και συν., 1994; Nardini και συν., 1995; Abu-Amsha και συν., 1996).

1.4.2. Επιδράσεις στην Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια ισορροπημένη γενετικά ελεγχόμενη κυτταρική αντίδραση σε εξειδικευμένα περιβαλλοντικά ή αναπτυξιακά ερεθίσματα που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση είναι απαραίτητη στη φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού και η απορρύθμιση της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε ένα φάσμα ανωμαλιών, από εμβρυική θνησιμότητα, ειδική ιστική διαταραχή έως και αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου. Φαίνεται ότι σχετίζεται με τη σύνθεση ή ενεργοποίηση ενός αριθμού κυτταροπλασματικών πρωτεασών, που προκαλείται από ένα πλήθος ερεθισμάτων, που συμπεριλαμβάνονται η έλλειψη αυξητικών παραγόντων, η κατάληψη ειδικών υποδοχέων (π.χ. Fas, Tumor Necrosis Factor TNF), η ιϊκή λοίμωξη και η απώλεια επαφής των κυττάρων μεταξύ τους. Έχουν αναγνωρισθεί πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ρυθμιστικές της απόπτωσης, εκ των οποίων άλλα επάγουν (Bax) και άλλα αναστέλλουν (Bcl-2) τον κυτταρικό θάνατο. Τα σχετικά επίπεδα της έκφρασης αυτών των δύο βασικών γονιδίων, φαίνεται ότι ρυθμίζουν την κυτταρική βιωσιμότητα. Επιπλέον το γονίδιο P53, μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα γονίδιο προαγωγέας της απόπτωσης, ενώ θεωρείται ότι η δράση του σχετίζεται με αύξηση της μεταγραφής του Bax.

Οι πολυφαινόλες όπως η κερκετίνη, η ρεσβερατρόλη, το ελλαγικό οξύ και η επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλικό (EGCG) έχει δειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση (Ramos., 2007) και για το λόγο αυτό αποτελούν χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα η χορήγηση EGCG σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνών σχετικών με τα μονοπάτια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου όπως οι κασπάσες -3, -8 και -9 (Nishikawa και συν., 2006) καθώς και την αναστολή άλλων πρωτεϊνών όπως οι ανασταλτικές πρωτεΐνες (X-linked IAP (XIAP), Bcl-2, Bcl-x1 και Bid (Mertens-Talcott και συν., 2005)

Άλλο ένα παράδειγμα αποτελεί η κερκετίνη, η οποία επάγει την απόπτωση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές και DNA-fragmentation (Mertens-Talcott., 2005), ενεργοποίηση των κασπασών -3, -7, και -9, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, (π.χ. Bcl-x1 Bcl-2), και αύξηση της έκφρασης των προ-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών (π.χ. Bax).

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί μάλιστα τα τελευταία χρόνια, συγκλίνουν στην συνεργική δράση των πολυφαινολών ως προς την επαγωγή της απόπτωσης, όπως για παράδειγμα το ελλαγικό οξύ με την κερκετίνη (Mertens-Talcott., 2005)

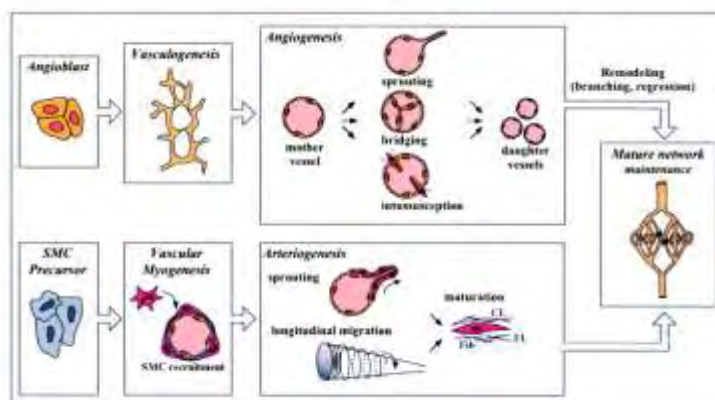
1.4.3. Επιδράσεις στην Αγγειογένεση

1.4.3.1. Αγγειογένεση

Τα αγγεία του σώματος στον αυλό τους καλύπτονται σε όλο το μήκος τους από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρτιότητα και στην σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό του αγγειακού τοιχώματος και ο ρόλος τους είναι απαραίτητος για διαδικασίες όπως η μεταφορά αίματος, οξυγόνου και θρεπτικών υλικών στους διάφορους ιστούς. Επειδή τα αγγεία του σώματος είναι επιρρεπή σε διαρροές και αποφράξεις, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν υποστεί έντονη εξελικτική πίεση με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών για την ρύθμιση της πηκτικότητας του αίματος εξασφαλίζοντας την αιμόσταση και την διαπερατότητα των αγγείων. Παράλληλα, όντας η διαχωριστική γραμμή μεταξύ ιστών και έμμορφων αμυντικών κυττάρων του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν αναπτύξει συστήματα μεταφοράς των αμυντικών κυττάρων του οργανισμού από το αίμα στους ιστούς σε περιπτώσεις μόλυνσης από μικροοργανισμούς, συμμετέχοντας στην τοπική άμυνα και τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπλέον, το αγγειακό δίκτυο δείχνει αξιοσημείωτη πλαστικότητα για να ανταποκρίνεται στην δημιουργία νέων αγγείων όταν αυτό είναι απαραίτητο, όπως για παράδειγμα μετά από καταστροφή ιστών.

Οι λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζονται από πληθώρα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τους παράγοντες αυτούς καθώς και τα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν, συνιστούν ένα πολύπλοκο σύστημα το οποίο απαιτεί εξαιρετικό συντονισμό. Ένα τέτοιο πολύπλοκο σύστημα είναι επιρρεπές σε απορρύθμιση και αποτελεί την πηγή πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Θρομβώσεις, αθηρομάτωση, υπέρταση, αιμοραγίες, αγγειογένεση των όγκων και άλλες αγγειακές ασθένειες προκαλούν πάνω από το 50% των θανάτων στις προηγμένες κοινωνίες.

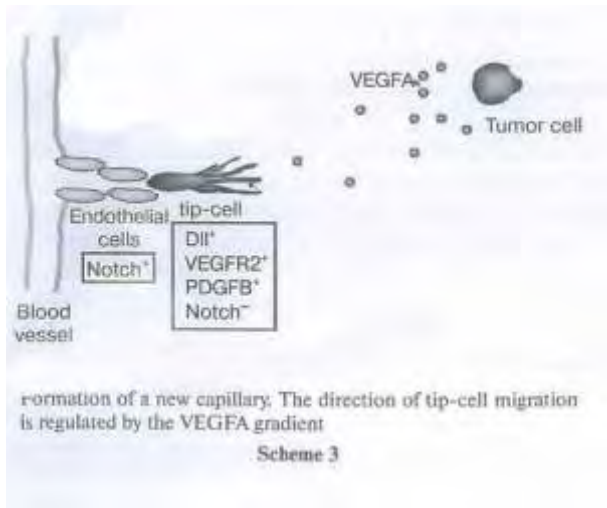
Η δημιουργία του αγγειακού συστήματος εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Κατά την αρχή της ανάπτυξης του εμβρύου, ξεκινάει ο σχηματισμός του αιμοφόρου αγγειακού συστήματος μέσω της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis). Συγκεκριμένα, μεσοδερμικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε αιμαγγειοβλάστες, προγενήτορες των αιματοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία δημιουργούν τα αιμοφόρα αγγεία. Σε περαιτέρω διαφοροποίηση οι αιμαγγειοβλάστες παράγουν τους αγγειοβλάστες όπου η συσσώρευσή τους οδηγεί στον σχηματισμό νησίδων αίματος. Το στάδιο της αγγειακής διαφοροποίησης ολοκληρώνεται με την συνένωση των νησίδων αίματος η οποία οδηγεί στην εμφάνιση του πρώιμου αγγειακού συμπλέγματος. Είναι ενδιαφέρον ότι ήδη σε αυτό το στάδιο τα τριχοειδή αγγεία εμφανίζουν αρτηριακό ή φλεβικό χαρακτήρα, συνεπώς φαίνεται ότι η κυτταρική εξειδίκευση είναι γενετικά προγραμματισμένη. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αγγειογένεσης (angiogenesis) κατά την οποία ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του αγγειακού συμπλέγματος και γίνονται όλοι οι περαιτέρω μετασχηματισμοί του αγγειακού δικτύου όπου νέα αγγεία σχηματίζονται από τα ήδη υπάρχοντα. Έτσι το πρώιμο αγγειακό σύμπλεγμα επεκτείνεται σε τριχοειδή παρακλάδια και τέλος σχηματίζεται το υψηλά οργανωμένο αγγειακό δίκτυο. Κατά την αγγειογένεση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ανάλογα με τον τύπο του αγγείου (αρτηρία, φλέβα, τριχοειδές) τα τοιχώματα των αγγείων ωριμάζουν, καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσελκύουν και συνδέονται στενά με περικύτταρα (στα τριχοειδή) και με πολλαπλό στρώμα μυϊκών κυττάρων (στις αρτηρίες και τις φλέβες) με μια διαδικασία που ονομάζεται αγγειακή μυογένεση (vascular myogenesis) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση

Ωστόσο, στους ενήλικες οργανισμούς η αγγειογένεση ξεκινάει από ήδη ώριμα αγγεία. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός νέων αγγείων ξεκινά με την τοπική καταστροφή του τείχους των προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων από ενδοθηλιακές μεταλλοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (MPPs), την ενεργοποίηση της αύξησης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετάστασης τους. Η αύξηση και η μετάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων αυξητικών παράγοντων π.χ. basic fibroblast growth factor (Bfgf) και vascular endothelial growth factor (VEGF). Υπάρχει ένας μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο γίνεται δυνατή η επιλογή συγκεκριμένων ενδοθηλιακών κύτταρων εντός των τριχοειδών αγγείων, από τα οποία ξεκινά η αγγειογενετική επέκταση. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται 'tip cells' και είναι αυτά που αντιδρούν με το συστατικό του VEGFA που καθορίζει την κατεύθυνση της μετακίνησης τους, ώστε να κινούνται προς το αγγείο που νεοσχηματίζεται. Επιπλέον, ενεργοποιούν απεκριμένες ή εξωκυτταρικές πρωτεΐνες για την μερική καταστροφή της βασικής μεμβράνης. Υπό την επίδραση του ίδιου αυξητικού παράγοντα, VEGFA, τα υπόλοιπα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνονται και δημιουργούν σωληνοειδείς δομές όπου με βάση αυτές τις δομές τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων σχηματίζονται (εικόνα 9). Στους ενήλικες, ο σχηματισμός και η αύξηση των νέων αγγείων βρίσκονται υπό αυστηρό έλεγχο. Αυτές οι διαδικασίες ενεργοποιούνται μόνο κάτω από αυστηρές συνθήκες όπως η επούλωση πληγών. Η αυστηρή ρύθμιση του συστήματος και η ισορροπημένη λειτουργία είναι πολύ σημαντικές για τον οργανισμό, διότι και ο υπερβολικός σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων και η ανεπαρκής ανάπτυξη των αγγείων οδηγούν σε σοβαρές ασθένειες. Για παράδειγμα, υπερβολική αγγειακή ανάπτυξη και δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων παρατηρείται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, την διαβητική ρετινοπάθεια καθώς και στον σχηματισμό καρκινικών όγκων. Ιδιαίτερα, η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του όγκου. Σε ένα αυξανόμενο όγκο, όπως και στους άλλους ιστούς, πρέπει να τους παρέχεται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά έτσι ώστε να διατηρήσουν την ζωτική τους λειτουργία. Είναι γνωστό ότι χωρίς παροχή αίματος οι διαστάσεις του όγκου δεν ξεπερνούν τα 2-3 mm³ εξαιτίας της υποξίας που οδηγεί στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό υπάρχουν μηχανισμοί που ενεργοποιούν την αγγειογένεση στους καρκινικούς όγκους. Κατά συνέπεια, μια από τις βασικές στρατηγικές της καρκινικής χημειοπροστασίας είναι η αναστολή της αγγειογένεσης. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιο πιθανόν η χημειοπροστασία να είναι αποτελεσματική στα αρχικά στάδια, όπου η αύξηση του

καρκινικού όγκου είναι περισσότερο εξαρτώμενη από την αγγειογένεση (Folkman και συν., 1995).



Εικόνα 9: απεικόνιση σχηματισμού τριχοειδούς αγγείου.

1.4.3.2 VEGF: Βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μορίων είναι γνωστά ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως θετικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης (π.χ. Fibroblast growth factors FGFa και FGFb, transforming growth factors TGFa και TGFb, hepatocyte growth factors HGF, tumor necrosis factor TNF), δεν είναι όλοι όμως αυτοί οι παράγοντες ικανοί να επηρεάσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το πιο κρίσιμο γεγονός στη ρύθμιση της αγγειογένεσης είναι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος στο οποίο εμπλέκεται και ο VEGF.

Σε *in vitro* συνθήκες, ο VEGF προκαλεί την αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αρτηρίες, φλέβες και αγγεία της λέμφου με απευθείας επίδραση σε αυτά. Επίσης, σε *in vitro* πειράματα, ο VEGF αναστέλλει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από έλλειψη ορού. Έχει δειχθεί ότι ο VEGF επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι ο VEGF είναι ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης σε μεγάλο αριθμό πειραμάτων *in vivo*. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό ορισμένων ισομορφών του VEGF είναι η ικανότητα τους να προσδένουν την ηπαρίνη επειδή αυτό ορίζει αν η πρωτεΐνη θα συσσωρευθεί στο εξωκυτταρικό στρώμα ή θα απελευθερωθεί και

θα είναι προσιτή για αλληλεπίδραση με τα κύτταρα προκειμένου να ασκήσει την αντι-αγγειογενετική της δράση.

Οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας VEGF προκαλούν τις βιολογικές επιδράσεις τους μέσω αλληλοεπίδρασης με υποδοχείς που εντοπίζονται στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπάρχουν τρεις υποδοχείς των VEGF : VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (fetal liver kinase-1), και VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase-4) οι οποίοι εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Και οι τρεις υποδοχείς είναι κινάσες της τυροσίνης που αυτό-φωσφορυλιώνονται κατά τη σύνδεση με το VEGF (εικόνα 10). Ο VEGFR-1 έχει υψηλή τάση πρόσδεσης στον VEGF αλλά μειωμένη ικανότητα σηματοδότησης οπότε αποτελεί και αρνητικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης. Ο VEGFR-2 εμπλέκεται απευθείας στην σηματοδότηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε μιτωτικές διαιρέσεις. Ο VEGFR-3 αρχικά εκφράζεται σε λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται στην αγγειακή ανάπτυξη που προκαλείται από την υποξία. Η ενεργοποίηση των VEGFs οδηγεί στην στρατολόγηση σηματοδοτικών μορίων και άλλων κινασών, προκαλώντας μονοπάτια μεταγωγής σήματος που προάγουν τη μεταγραφή γονιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούνται για την αγγειογένεση.

1.4.4 Επίδραση πολυφαινολών στην αγγειογένεση

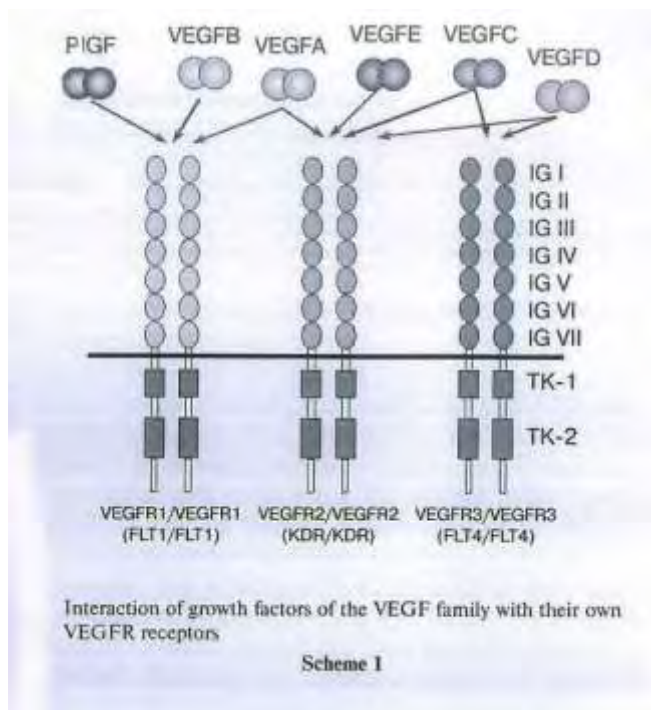
Όπως συμπεραίνεται από τα παραπάνω, η αγγειογένεση αποτελεί ένα στάδιο κλειδί στην αύξηση του όγκου, στην διείσδυση και στην μετάσταση αυτού. Τα φαινολικά συστατικά διαθέτουν αντι-αγγειογενετικές επιδράσεις, μα οι μοριακοί μηχανισμοί τους δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι. Έχει δειχθεί ότι η αντιαγγειογενετική δράση του ελλαγικού οξέος, της κερκετίνης, της ρεσβερατρόλης και άλλων πολυφαινολών ασκείται μέσω μείωσης της έκφρασης του Vascular endothelium growth factor (VEGF), του VEGF receptor-2, του PDGF, του PDGF receptor PDGFR, του hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a), των matrix metalloproteases (MMPs) καθώς και με αναστολή της φωσφορυλίωσης του EGFR, του VEGF και του PDGFR .

Για παράδειγμα η κερκετίνη, η μυρικετίνη, η καμπφερόλη και η γαλανίνη αναστέλλουν τις σωληνοειδείς δομές των HUVEC κυττάρων που επάγονται από τον VEGF παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αναστολή της αγγειογένεσης (Kim J και συν., 2006). Οι Schindler και Mentleiny έχουν αναφέρει ότι τα φλαβονοειδή μειώνουν την απελευθέρωση του VEGF από καρκινικά κύτταρα του στήθους με την εξής σειρά ανάλογα με την ικανότητα αναστολής:

Ναριγκίνη >ρουτίνη >απιγενίνη >γενιστίνη >καμπερόλη.

Ενώ το EGCG επάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας την κασπάση-3, καταστέλλοντας τις πρωτεΐνες Bcl-2, XIAP, και Mcl-1, οι οποίες μετέπειτα αναστέλλουν τον αυξητικό παράγοντα VEGF και τον υποδοχέα VEGF-R1 καθώς και τη φωσφορυλίωση του VEGF-R2 (Arts C., 2001).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η κυτταροστατική δράση των πολυφαινολών σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζει επιλεκτικότητα, δηλαδή παρουσιάζεται στα καρκινικά και όχι στα φυσιολογικά κύτταρα. Γενικά η χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών παρατηρείται και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης, είτε δρώντας ως αναστολείς της δράσης του καρκινογόνου στη φάση της έναρξης είτε ως παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης στις φάσεις της προαγωγής και προόδου. Παρ' όλα αυτά περαιτέρω έρευνες και πειράματα είναι απαραίτητα για να γίνουν γνωστοί και οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν.



Εικόνα 10: απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των αυξητικών παραγόντων της οικογένειας VEGF με τους υποδοχείς VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3.

1.5 Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικου Σαντορίνης καθώς και φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται σε αυτό στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των HepG₂ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ ο προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης έγινε με τη μέθοδο Cell death detection Elisa. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στη δράση των κασπασών 3, 8 και 9 οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης.

Επίσης, εξετάστηκε *in vitro* η επίδραση του εκχυλίσματος στην αγγειογένεση χρησιμοποιώντας την μέθοδο Tube formation assay με τα ενδοθηλιακά κύτταρα EAhy926.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

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

2.1.2. Θρεπτικά υλικά

Για την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 : Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM high glucose) της εταιρείας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum) της εταιρείας Biochrom (Μ.Β.). Για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% (Gibco).

Για την κυτταρική σειρά EAhy926: Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM low glucose) της εταιρείας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum) της εταιρείας Biochrom (Μ.Β.). Για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% (Gibco).

2.1.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ HepG2

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 καλλιεργήθηκαν σε 75-cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) (Gibco BRL) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι γεμάτη με κύτταρα στο 80%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης 0,25%. Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 7 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5 mL) εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.1.4. Εκχύλισμα

Το εκχύλισμα που εξετάστηκε ήταν από βόστρυχο αμπέλου (*Vitis vinifera*) της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης και απομονώθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Η σύστασή του παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα:

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

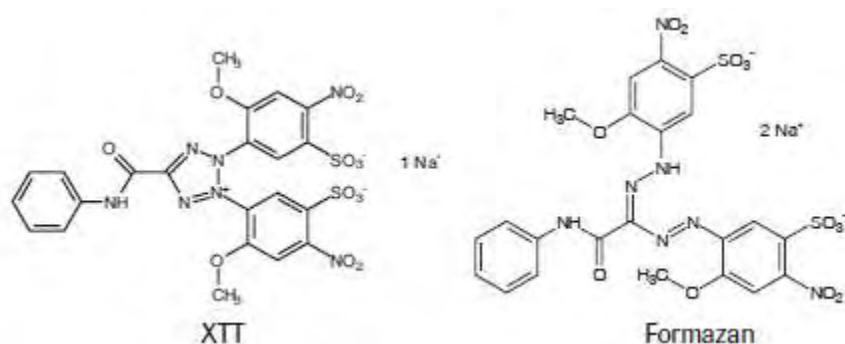
2.1.5. Διαδικασία εκχύλισης : Τα υπέργεια τμήματα των φυτών αποξηράνθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ποσότητα των τμημάτων φυτών χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v), (αιθανόλη 2/1 v/v) σε ειδική συσκευή αυτόματης εκχύλισης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο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

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT

2.2.1.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης και των φυτικών πολυφαινολών γαλλικό οξύ, (+)-κατεχίνη, trans-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ και κερκετίνη-3-O-ραμνοσίδη χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση.



Εικόνα 10: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό formazan από ζωντανά κύτταρα.

2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των HepG2 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ή των φυτικών πολυφαινόλων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. (Το μείγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν μόνο ηπατικά κύτταρα και το XTT/reagent, καθώς και δείγματα μάρτυρες που περιέχουν τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των ουσιών επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 490 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

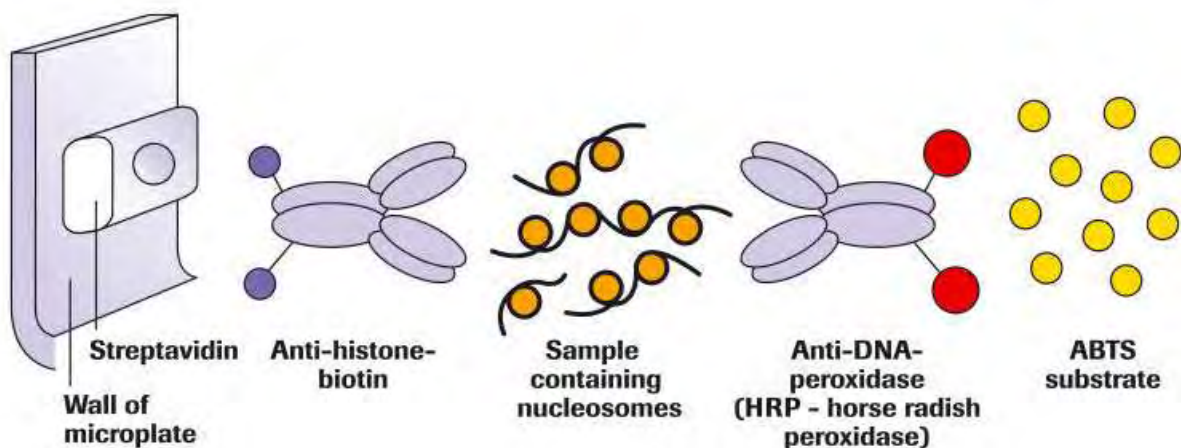
$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

2.2.2. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο Cell Death Detection ELISA.

2.2.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης, απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε το kit 'ELISA cell death detection' της εταιρείας Roche. 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 405 nm.



Εικόνα 11: Το σχήμα απεικονίζει την αρχή της μεθόδου ανίχνευσης του κυτταρικού θανάτου – ELISA plus.

2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Αιώρημα καρκινικών κυττάρων HepG2 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (10.000 κύτταρα/θέση). Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37⁰C 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. Χρησιμοποιήθηκαν 2 συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος: 50μg/ml και 100 μg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, προσθέτουμε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος για την λύση των κυττάρων και επωάζουμε για 1 ώρα στους 25⁰C σε plate shaker. Μετά την επώαση μεταφέρουμε το κυτταρόλυμα σε σωληνάκια του 1 ml και φυγοκεντρούμε στα 200Xg για 10 min. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 20 μl από το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) και 80 μl από το ανοσοαντιδραστήριο που περιέχει το 1^ο και το 2^ο αντίσωμα σε τριβλίο με 96 θέσεις όπου κάθε θέση είναι καλυμμένη με στρεπταβιδίνη, και επωάζουμε για 2 ώρες στους 25⁰C με ανάδευση σε plate shaker. Μετά την επώαση αφαιρούμε το διάλυμα από κάθε θέση και κάνουμε 3 πλύσεις με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης. Μετά προσθέτουμε σε κάθε θέση 100 μl διαλύματος ABTS και επωάζουμε με ανάδευση σε plate shaker για 10-20 λεπτά ή μέχρι να εμφανιστεί χρώμα. Στη συνέχεια προστίθεται 'stop solution' για να σταματήσει η αντίδραση 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 της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε διπλά δείγματα. Ο παράγοντας εμπλουτισμού που δείχνει την αύξηση στη συγκέντρωση των μονο- και ολιγο-νουκλεοσωμάτων λόγω της απόπτωσης υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Παράγοντας εμπλουτισμού} = \text{O.D.}_{\text{δείγματος}} / \text{O.D.}_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}$$

2.2.3. Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9

2.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2 μετά από επίδραση του εκχύλισματος βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης χρησιμοποιήθηκε το kit 'Caspases Colorimetric assay' της εταιρείας Roche. Σε αυτή την μέθοδο αρχικά γίνεται λύση των κυττάρων και στο κυτταρόλυμα προσδιορίζεται η δράση των κασπασών με την προσθήκη ενός πεπτιδίου που αποτελεί εξειδικευμένο υπόστρωμα για κάθε κασπάση. Το πεπτιδιο-υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο με το χρωμοφόρο μόριο p-νιτροανιλίνη. Η διάσπαση του πεπτιδίου από τις κασπάσες απελευθερώνει την p-νιτροανιλίνη η οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Η δράση των κασπασών είναι σε άμεση συνάρτηση με την απορρόφηση της p-νιτροανιλίνης.

2.2.3.2. Πειραματική διαδικασία

Αιώρημα καρκινικών κυττάρων HepG2 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε φλάσκα των 75 cm². Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37⁰C και σε 5% CO₂ μέχρι να καλύψουν το 60-70% της φλάσκας. Στη συνέχεια αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Ταυτόχρονα προσθέτουμε το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 100 µg/ml και επωάζουμε τα κύτταρα με το εκχύλισμα για 24 ώρες. Μετά την επώαση συλλέγουμε τα κύτταρα με προσθήκη τρυψίνης 0,25% και τα μετρούμε με πλάκα κυτταρομέτρησης Neubauer. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στα 250Xg για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση αφαιρούμε το υπερκείμενο και στο κυτταρικό ίζημα προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων (25 µl ανά 1X10⁶ κύτταρα) και επωάζουμε για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000Xg για 1 λεπτό. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διατηρείται στον πάγο. Στο κυτταρόλυμα υπολογίζεται με την μέθοδο Bradford η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Μετά σε θέσεις ενός τριβλίου με 96 θέσεις προστίθενται 50 µl από το κυτταρόλυμα, 50 µl από 2X ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης και 5 µl του πεπτιδίου-υποστρώματος. Επωάζουμε τα αντιδραστήρια στους 37⁰C για 2 ώρες. Μετρούμε την απορρόφηση σε ELISA plate reader στα 405 nm και διαιρούμε την απορρόφηση με τα mg των συνολικών πρωτεϊνών στο δείγμα έτσι ώστε η ενζυμική δράση να υπολογίζεται ανά mg πρωτεΐνης. Κάθε πείραμα περιλάμβανε αρνητικούς μάρτυρες (κύτταρα χωρίς το εκχύλισμα), μάρτυρες που δεν περιείχαν το κυτταρόλυμα και μάρτυρες χωρίς το υπόστρωμα. Έγιναν

2 πειράματα για την κάθε κασπάση και στο κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα για το εκχύλισμα και τους μάρτυρες. Σε κάθε δείγμα υπολογιζότανε 2 φορές η δράση της αντίστοιχης κασπάσης.

2.2.4. 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 και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) (Gibco) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι γεμάτη με κύτταρα στο 80%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης 0,25%. Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 5 min 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).

2.2.5. Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης εκχυλίσματος B10 στην κυτταρική σειρά EAhy926 με τη μέθοδο Trypan blue exclusion assay

Η μέθοδος του προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος με τη χρήση του trypan blue βασίζεται στο γεγονός ότι στα νεκρά κύτταρα λόγω καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης εισχωρεί η χρωστική και τα κύτταρα βάφονται μπλε ενώ τα ζωντανά κύτταρα όχι.

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100.000 κύτταρα/θέση ενός τριβλίου με 24 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και τα επωάζουμε για 24 ώρες προκειμένου να προσκολληθούν. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις (20μg/ml, 40μg/ml, 80μg/ml, 160μg/ml και 320μg/ml) του

εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό με 5% FBS τελικού όγκου 500 μl. Επωάζουμε τα κύτταρα με το εκχύλισμα για 24 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο, πραγματοποιούμε πλύσεις με 1 ml PBS και επωάζουμε τα κύτταρα με 25 μl τρυψίνης 0,25% έως ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και στη συνέχεια τα μεταφέρουμε σε σωληνάκια του 1 ml όπου προσθέτουμε ίσο όγκο της χρωστικής trypan blue. Επωάζουμε τα κύτταρα με την χρωστική trypan blue για 5 min και στη συνέχεια μετρούμε τον αριθμό των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων στο μικροσκόπιο με την πλάκα Neubauer σε κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρες που περιείχαν μόνο ενδοθηλιακά κύτταρα (αρνητικοί μάρτυρες). Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Το % ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίστηκε από τον τύπο:

$\% \text{ ποσοστό βιωσιμότητας} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) / (\text{αριθμός συνολικών κυττάρων})$

2.2.6. Προσδιορισμός in vitro της αντι-αγγειογενετικής δράσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα με την μέθοδο σχηματισμού σωληνίσκων (TUBE FORMATION ASSAY)

2.2.6.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων να σχηματίζουν σωληνίσκους παρόμοιους με αυτούς που δημιουργούνται κατά την αγγειογένεση όταν καλλιεργούνται σε ένα ειδικό υπόστρωμα. Το καλλιεργητικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Matrigel Matrix Growth Factor Reduced της εταιρείας BD. Το υλικό BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced είναι μια διαλυτή βασική μεμβράνη που εξάγεται από το σάρκωμα ποντικού Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Το βασικό συστατικό του είναι η λαμινίνη, καθώς περιέχει και κολλαγόνο IV και πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (Kleinman, HK, 1983). Επιπλέον περιέχει αυξητικούς παράγοντες όπως tumour growth factor beta (TGF-beta), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), tissue plasminogen activator (TPA και άλλους αυξητικούς παράγοντες που αναπτύσσονται φυσιολογικά σε καρκινικούς όγκους του EHS) (Vukicevic S και συν., 1992) (Πίνακας 4). Λόγω της σύστασής του, το BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced είναι αποτελεσματικό για την προσκόλληση και την διαφοροποίηση διαφόρων τύπων κυτταρικών σειρών.

Πίνακας 4:Περιεκτικότητα των αυξητικών παραγόντων στο υλικό BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced

<i>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ</i>	<i>BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced</i>
Bfgf (pg/ml) ⁴	0-0.1
EGF(ng/ml)	< 0.5
IGF (ng/ml)	5
PDGF (pg/ml)	< 5
NGF (ng/ml)	< 0.2
TGF-beta (ng/ml)	1.7
%Protein that gels	83

2.2.6.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά 250 µl διαλύματος του υλικού BD Matrigel το οποίο διατηρείται στον πάγο προστίθενται σε ένα τριβλίο 24 θέσεων. Στη συνέχεια το τριβλίο μεταφέρεται σε κλίβανο στους 37⁰C με 5% CO₂ για 1 ώρα προκειμένου να πήξει. Αφού πήξει το BD Matrigel, σε κάθε θέση του τριβλίου προστίθεται εναιώρημα κυττάρων EAhy926 έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων να είναι 160.000 κύτταρα ανά θέση. Ταυτόχρονα προστίθεται το εκχύλισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (4 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml και 100µg/ml) με θρεπτικό υλικό 5% FBS. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας δηλαδή κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε το εκχύλισμα. Ακολουθεί επώαση 16 ωρών στον κλίβανο στους 37⁰C με 5% CO₂ ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη των σωληνίσκων και στη συνέχεια λαμβάνονται φωτογραφίες με ψηφιακή μηχανή Olympus και με το λογισμικό Imagej μετράται το συνολικό μήκος των σχηματιζόμενων σωληνίων σε κάθε θέση. Για κάθε θέση υπολογίστηκε το μήκος των σωληνίσκων σε συνολικά 6 οπτικά πεδία. Έγιναν 3 διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε

συγκέντρωση εξεταζότανε 2 φορές. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow). Το % ποσοστό της αναστολής σχηματισμού των σωληνίσκων λόγω της επίδρασης του εκχυλίσματος υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \left[\frac{\text{μήκος σωληνίσκων}_{\text{αρνητικού μάρτυρα}} - \text{μήκος σωληνίσκων}_{\text{δείγματος}}}{\text{μήκος σωληνίσκων}_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}} \right] \times 100$$

2.2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε όλες τις μεθόδους υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

3.1.1. Εκχύλισμα

Το εκχύλισμα από βόστρυχο σταφυλιών ποικιλίας Ασύρτικου Σαντορίνης ανέστειλε δοσοεξαρτώμενα την αύξηση των καρκινικών ηπατικών κυττάρων. Έτσι για παράδειγμα στη γραφική απεικόνιση που ακολουθεί διαφαίνεται ότι στην συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g/ml}$ του εκχυλίσματος η αναστολή στην κυτταρική αύξηση των HepG2 ήταν περίπου 35% ενώ πολύ μεγαλύτερη, περίπου 70%, σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$.

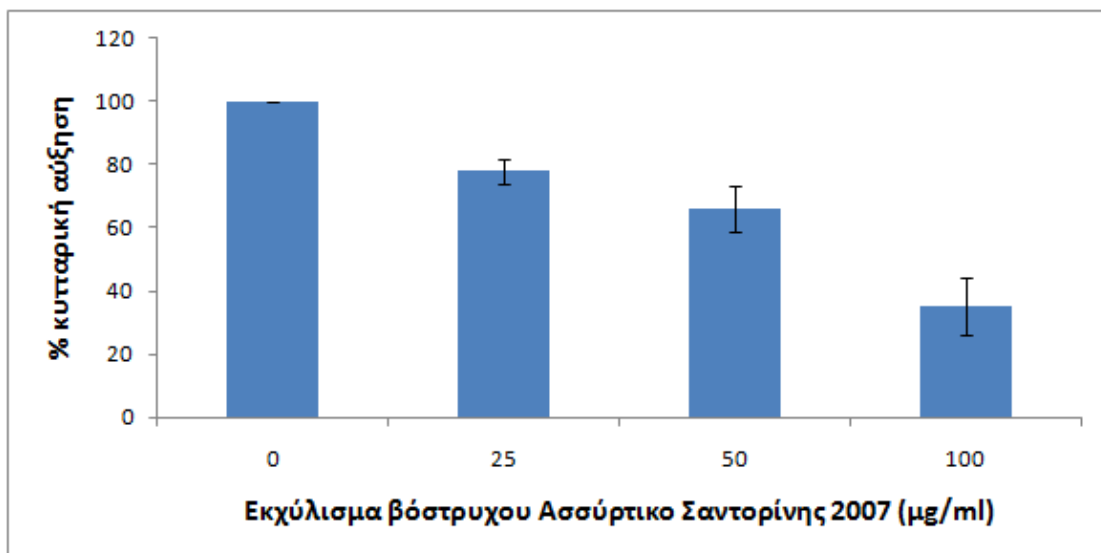
3.1.2. Φυτικές πολυφαινόλες

Συνολικά εξετάστηκαν έξι φυτικές πολυφαινόλες του εκχυλίσματος βόστρυχου ποικιλίας Ασύρτικου Σαντορίνης:

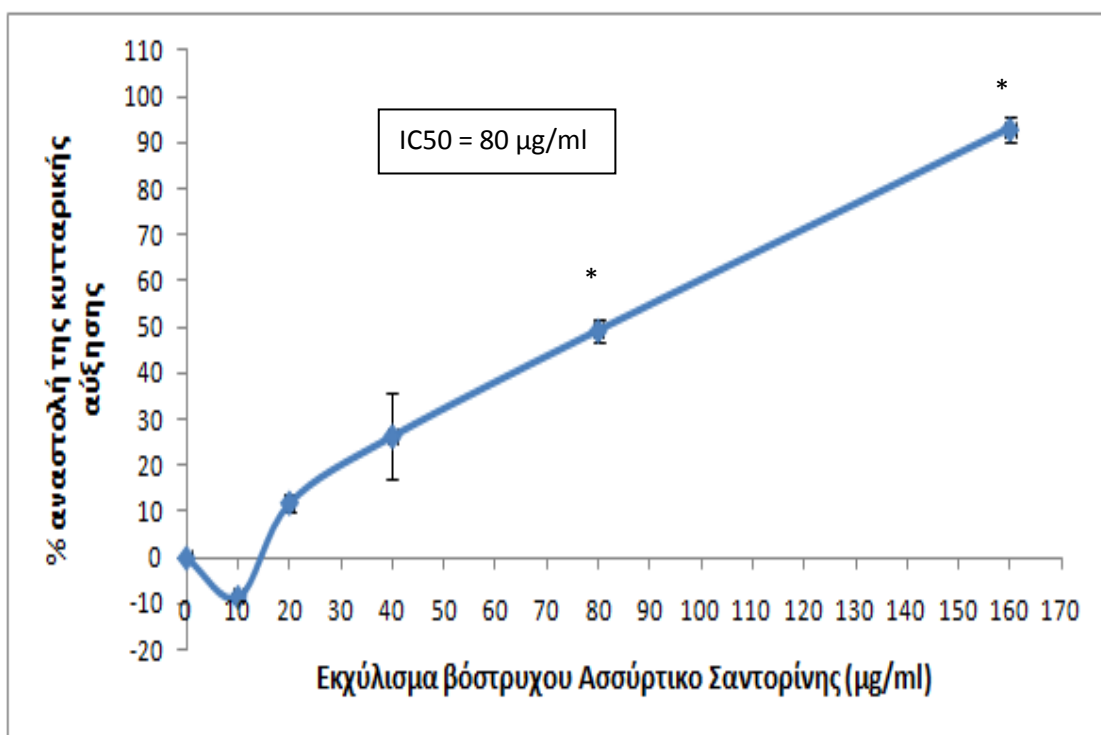
Το γαλλικό οξύ, εξετάστηκε σε πέντε συγκεντρώσεις (1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM και 100 μM). Στο γράφημα 3 φαίνεται ότι ήδη από τη συγκέντρωση των 5 μM το γαλλικό οξύ ανέστειλε την κυτταρική δράση κατά περίπου 35%.

Η κερκετίνη και η trans-ρεσβερατρόλη εξετάστηκαν σε έξι συγκεντρώσεις (1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM και 200 μM). Ήταν αξιοσημείωτο ότι οι δύο αυτές πολυφαινόλες παρουσίασαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις. Έτσι η κερκετίνη σε συγκεντρώσεις 1 μM και 5 μM παρουσίασε αναστολή της κυτταρικής αύξησης με ποσοστό περίπου 73% (Γράφημα 5) και η trans-ρεσβερατρόλη με ποσοστό 70%, σε συγκεντρώσεις 1 μM και 10 μM . (Γράφημα 9).

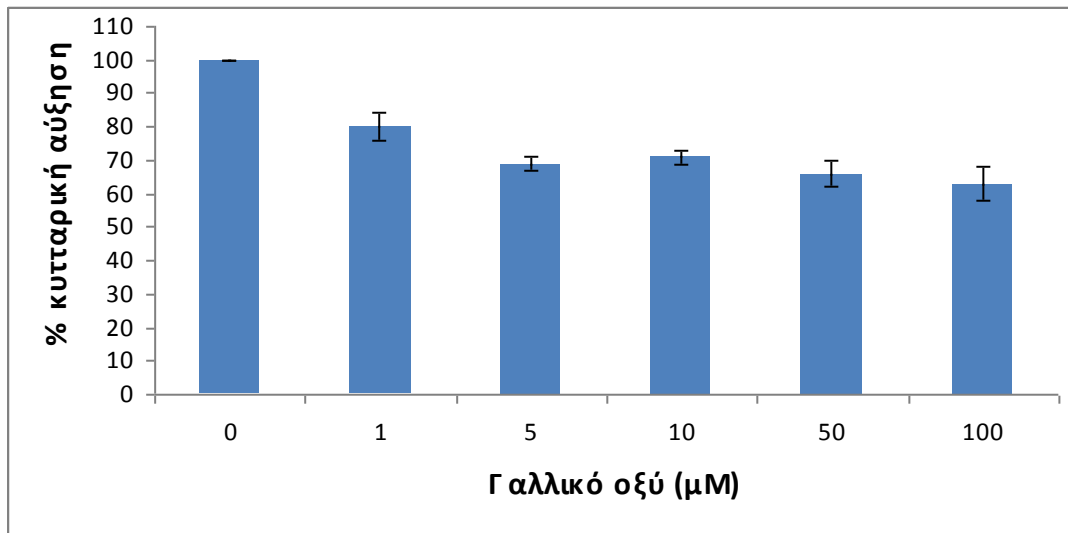
Μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση της (+) κατεχίνης, του κουμαρικού οξέος του καφεϊκού οξέος και της κερκετίνης 3-O-ραμνοσίδης σε πέντε συγκεντρώσεις (10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM). Στο γράφημα 4 φαίνεται ότι η (+) κατεχίνη προκαλεί αναστολή της κυτταρικής αύξησης στα 100 και 200 μM κατά 45 και 57% αντίστοιχα. Όσο αφορά το κουμαρικό οξύ φαίνεται από το γράφημα 6 ότι ανέστειλε την κυτταρική αύξηση κατά 35% σε συγκέντρωση 50 μM . Η κερκετίνη 3-O-ραμνοσίδη στις συγκεντρώσεις των 100 και 200 μM ανέστειλε κατά 23 και 30% αντίστοιχα την κυτταρική αύξηση (Γράφημα 8). Τέλος το καφεϊκό οξύ, σε συγκέντρωση 100 μM ανέστειλε την κυτταρική αύξηση περίπου 20% ενώ σε συγκέντρωση 200 μM κατά 35%. (Γράφημα 7).



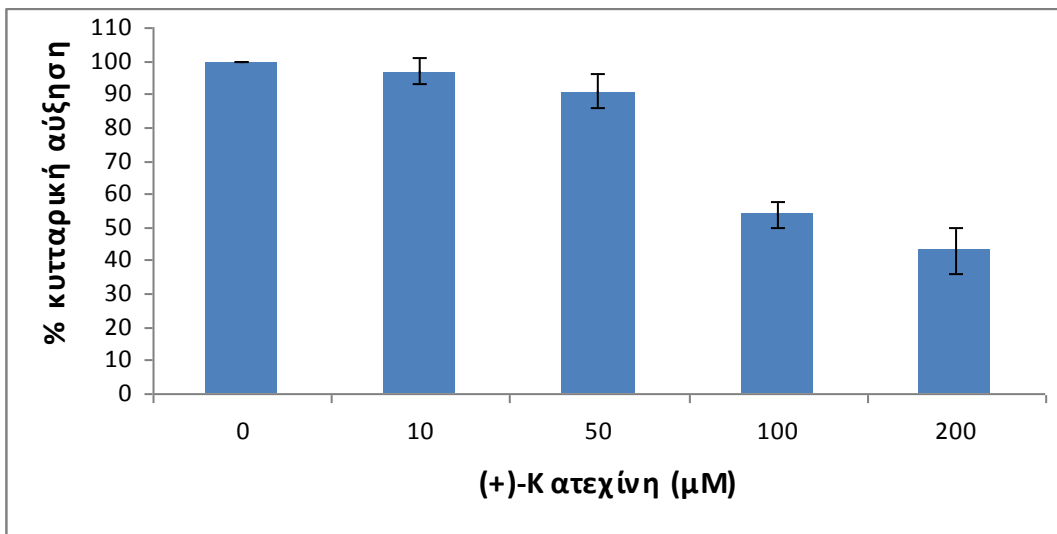
Γράφημα 1: Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης (2007) στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



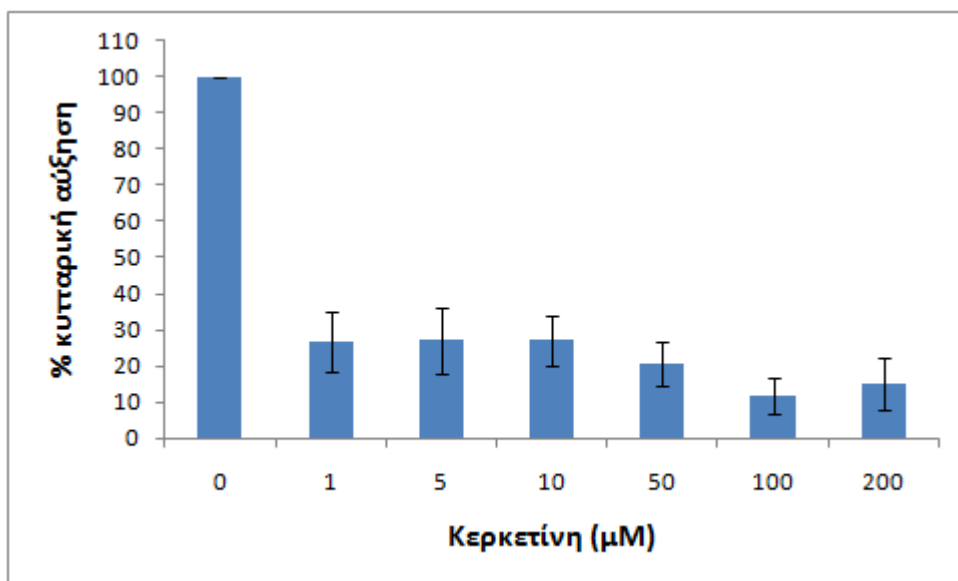
Γράφημα 2: Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων από την επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν το εκχύλισμα (αρνητικοί μάρτυρες).



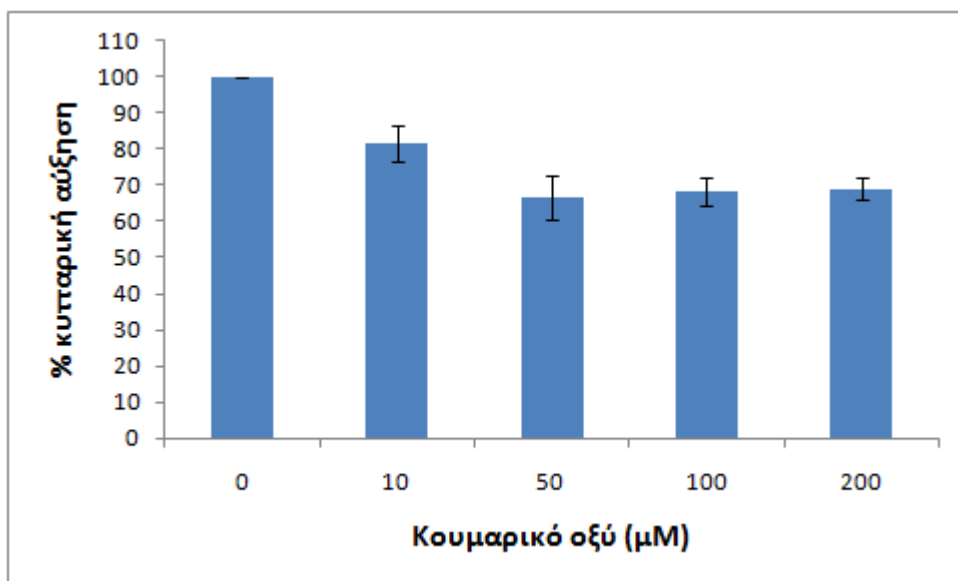
Γράφημα 3: Επίδραση του γαλλικού οξέος στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



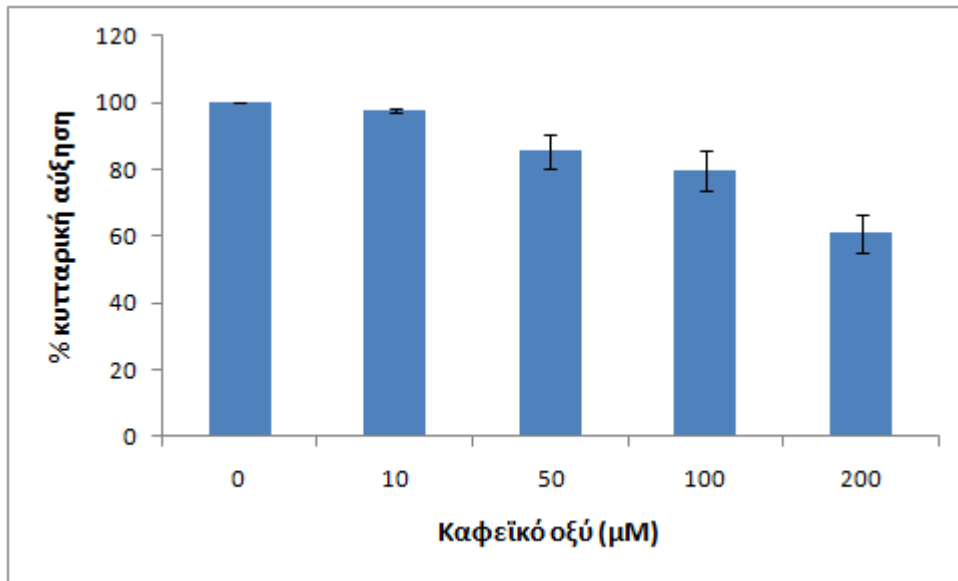
Γράφημα 4: Επίδραση της (+)-κατεχίνης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



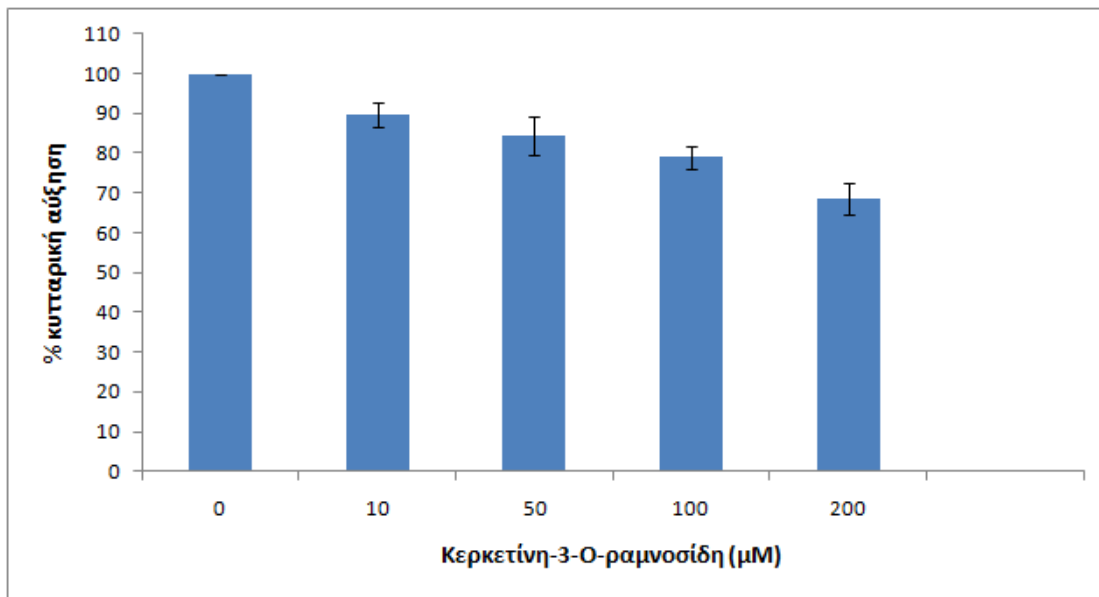
Γράφημα 5: Επίδραση της κερκετίνης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



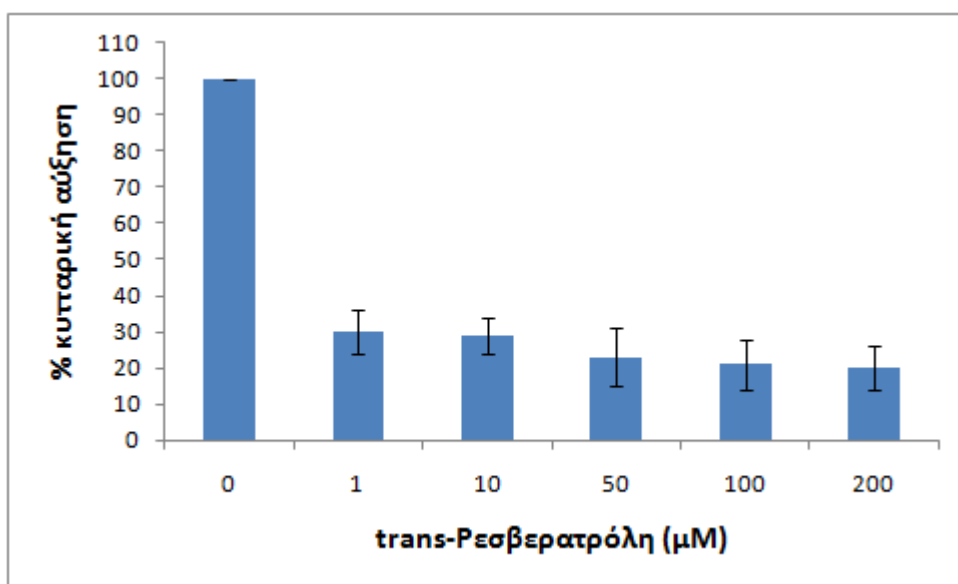
Γράφημα 6: Επίδραση του κουμαρικού οξέος στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



Γράφημα 7: Επίδραση του καφεϊκού οξέος στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2)



Γράφημα 8: Επίδραση της κερκετίνης-3-Ο-ραμνοσίδης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



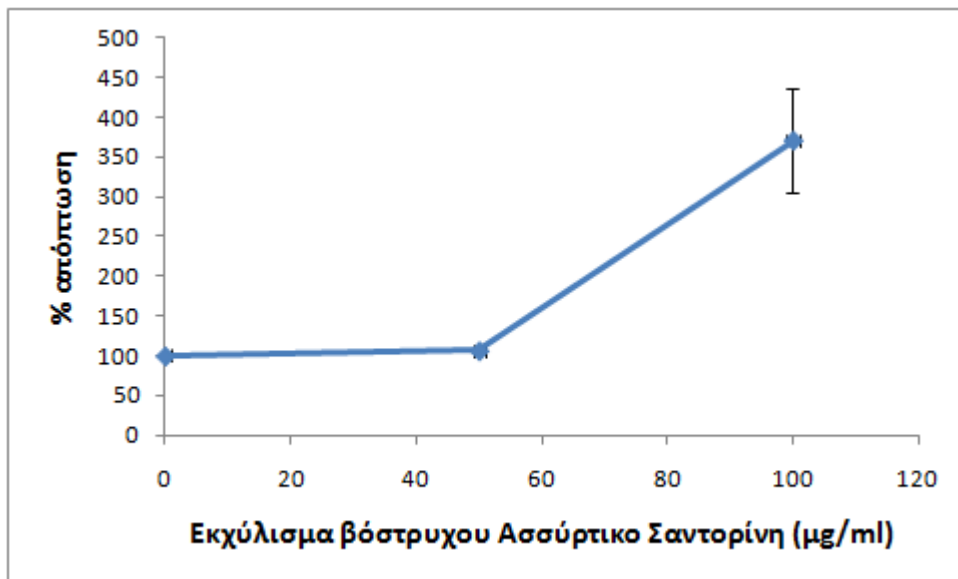
Γράφημα 9: Επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).

3.2. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο Cell death detection ELISA plus.

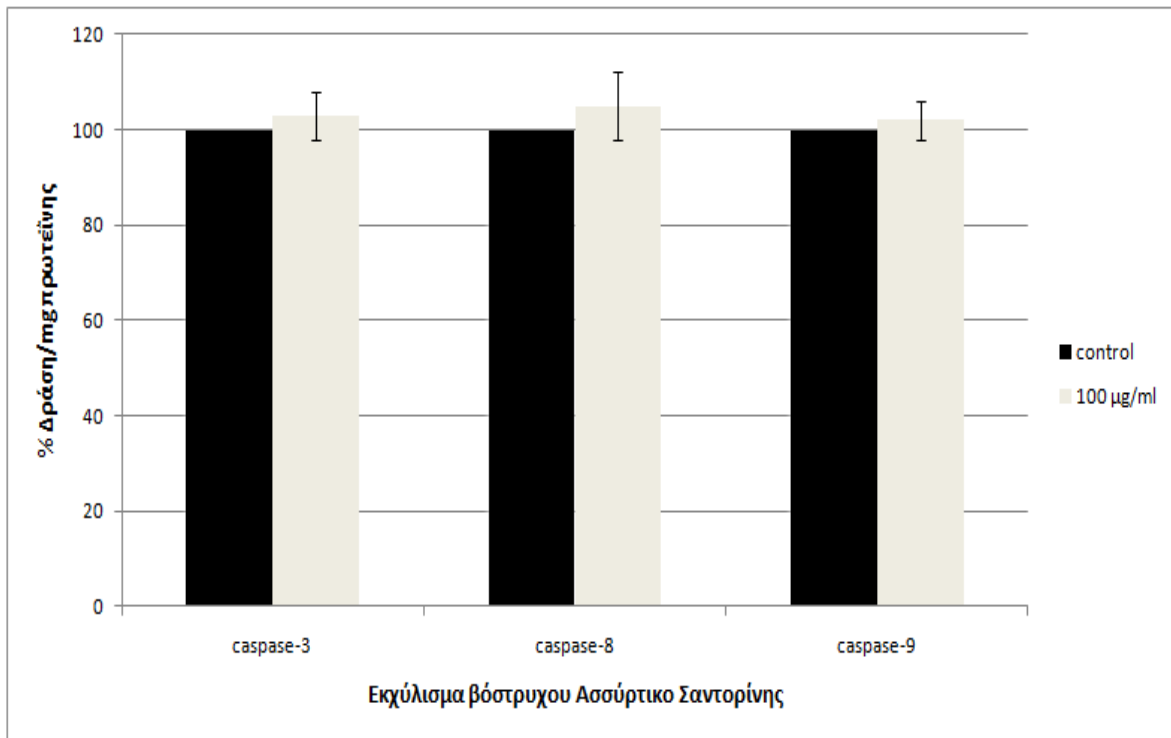
Το εκχύλισμα από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης, προκάλεσε απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στη συγκέντρωση των 100 μg/ml κατά περίπου 370%. Αυτό δείχνει ότι η αναστολή της κυτταρικής αύξησης από το εκχύλισμα οφείλεται στην πρόκληση απόπτωσης που θεωρείται σημαντικός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός έναντι του καρκίνου. Τα αποτελέσματα δίνονται στο γράφημα 10.

3.3 Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9

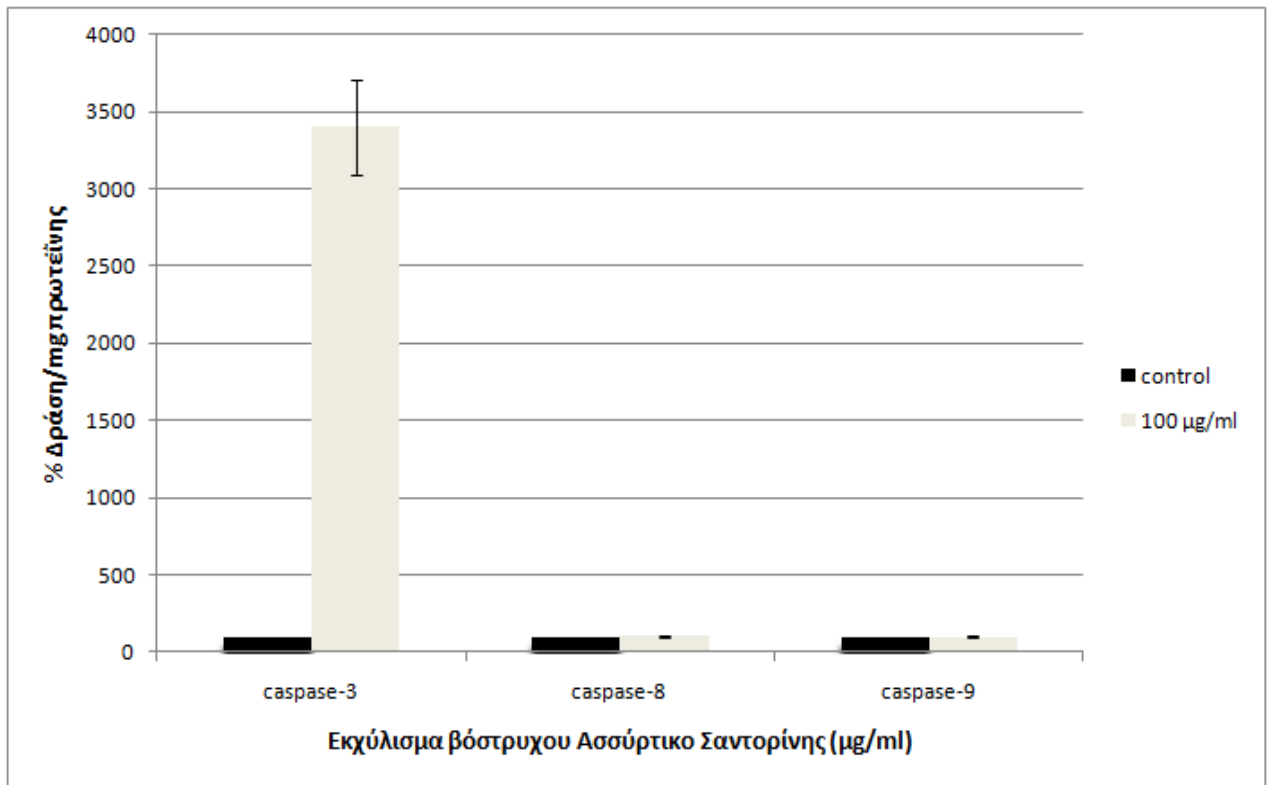
Εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης σε συγκέντρωση 100μg/ml στη δράση των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2. Όπως φαίνεται από το γράφημα 11 μετά από επώαση 24 ωρών το εκχύλισμα δεν επηρέασε την ενζυμική δράση των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2. Ωστόσο, μετά από επώαση 12 ωρών παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης της κασπάσης 3 περίπου κατά 35 φορές, αν και δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη δράση των κασπασών 8 και 9 (Γράφημα 12).



Γράφημα 10: Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης (2007) στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).



Γράφημα 11: Το διάγραμμα δείχνει την επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 στην δράση των κασπασών 3, 8 και 9 % στα κύτταρα HepG2 μετά από επώαση 24 ωρών.



Γράφημα 12: Το διάγραμμα δείχνει την επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 στην δράση των κασπασών 3, 8 και 9 % στα κύτταρα HepG2 μετά από επώαση 12 ωρών.

3.4. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του B10 στην κυτταρική σειρά EAhy926 με τη μέθοδο Trypan blue exclusion assay

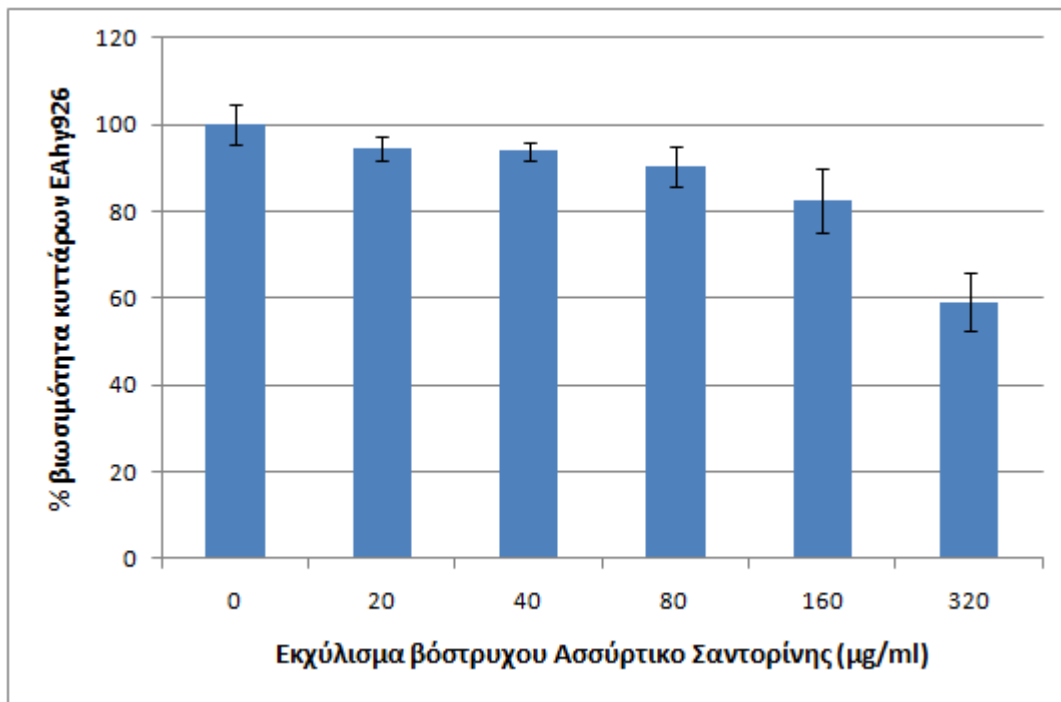
Εξετάστηκε η τοξική δράση του εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης (2007) στην κυτταρική σειρά EAhy926, με τη μέθοδο trypan blue assay, χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (20μM, 40μM, 80μM, 160μM, και 320μM). Στη συνέχεια υπολογίστηκε η επί τοις εκατό βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων υπό την προσθήκη της εκάστοτε συγκέντρωσης.

$\% \text{ ποσοστό βιωσιμότητας} = (\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων}) / (\text{αριθμός συνολικών κυττάρων})$

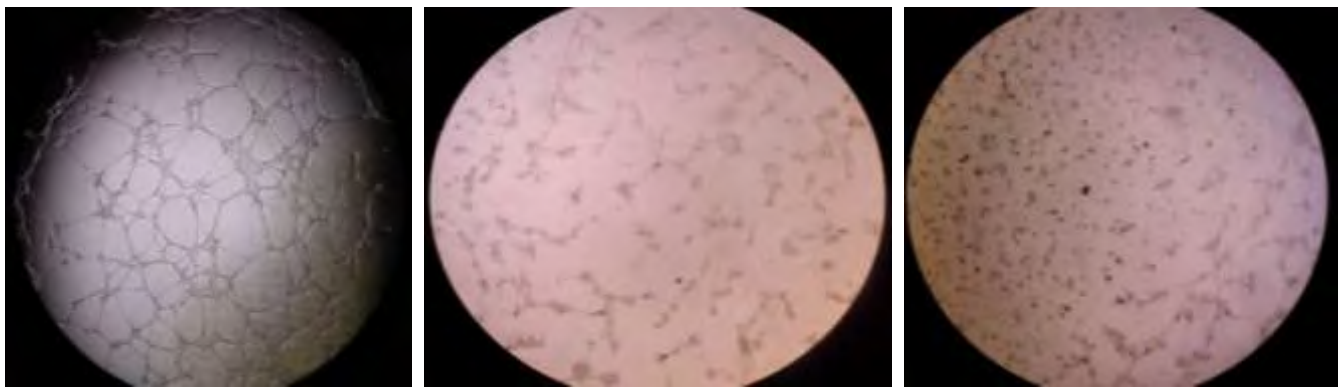
Στο γράφημα 11 διαφαίνεται ότι στις μικρές συγκεντρώσεις, 20μM, 40μM, 80μM, το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων κυμαίνεται στο 90%. Σε συγκέντρωση 160μM το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι περίπου 82% ενώ σε συγκέντρωση 320 μM μειώνεται στο 60%. Συνεπώς το εκχύλισμα δεν παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση, παρά μόνο στην υψηλή συγκέντρωση 320μM όπου παρουσιάζεται και το μικρότερο ποσοστό βιωσιμότητας των EAhy926.

3.5. Προσδιορισμός της αντι-αγγειογενετικής δράσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα με τη γρήση BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced

Ο σχηματισμός σωλήνων από ενδοθηλιακά κύτταρα όταν αναπτύσσονται σε ένα εξωκυτταρικό υπόστρωμα θεωρείται ένδειξη αγγειογένεσης. Συνεπώς, η αναστολή του σχηματισμού των σωλήνων μετά την προσθήκη μιας ουσίας στην καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένδειξη αντι-αγγειογενετικής δράσης. Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις (20, 50 και 100 μg/ml) εκχυλίσματος από βόστρυχο της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης. Ο σχηματισμός των σωληνίσκων ποσοτικοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ με το οποίο υπολογίστηκε το συνολικό μήκος των σωλήνων. Παρατηρήθηκε αναστολή των σχηματισμένων σωλήνων κατά 60% σε συγκέντρωση 50 μg/ml εκχυλίσματος, ενώ η συγκέντρωση 100 μg/ml εκχυλίσματος η αναστολή ήταν περίπου 90% (Γράφημα 12).



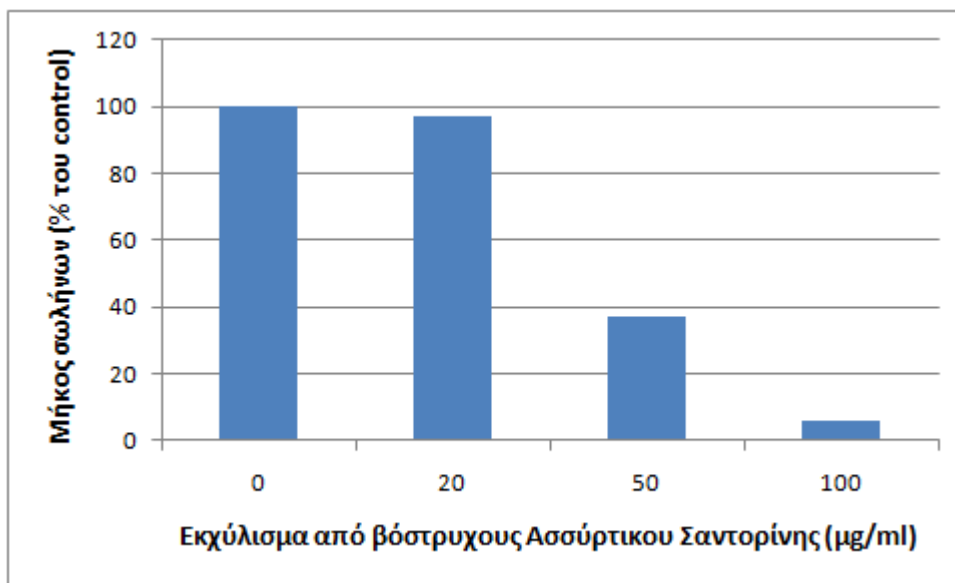
Γράφημα 13: Επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης στην επί % βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς Eahy926 με τη μέθοδο trypan blue assay.



Control

50 µg/ml

100 µg/ml



Γράφημα 14 : Εκχύλισμα από βόστρυχο της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης αναστέλλει τον σχηματισμό σωλήνων από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε Matrigel. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τον σχηματισμό των σωλήνων σε καλλιέργεια μάρτυρα (χωρίς προσθήκη του εκχυλίσματος) και σε καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκαν 50 και 100 µg/ml του εκχυλίσματος. (B) Στο διάγραμμα φαίνεται το % ποσοστό του μήκους των σωλήνων σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα, σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων στις οποίες προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις (20, 50 και 100 µg/ml) του εκχυλίσματος. Το συνολικό μήκος των σωλήνων μετρήθηκε με το λογισμικό ImageJ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος είναι μια πάθηση η οποία μπορεί να προσβάλλει κάθε ιστό και όργανο του σώματος, αποτελώντας τη δεύτερη πιθανή αιτία θανάτου σε Ευρώπη και Αμερική. Ο όρος αναφέρεται σε περίπου 150-200 διαφορετικές παθήσεις, ωστόσο έχουν 2 κοινά χαρακτηριστικά στοιχεία: την απεριόριστη αύξηση των κυττάρων και τις δυσλειτουργίες τις οποίες προξενεί αυτή. Ο Ιπποκράτης ήταν αυτός που έδωσε στην πάθηση του καρκίνου το όνομα της. Πολύ αργότερα, ο Valsalva, το 1704 υποστήριξε ότι αρχικά ο καρκίνος ήταν ένα τοπικό φαινόμενο που μπορούσε να αφαιρεθεί χειρουργικά ενώ σε πιο προχωρημένο στάδιο ο καρκίνος μπορούσε μέσω των λεμφαγγείων να μεταφερθεί αλλού στο σώμα. Στις μέρες μας είναι πλέον γνωστό πως η καρκινογενετική διαδικασία αποτελεί μια πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μια εκτεταμένη χρονικά περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης μέχρι την εμφάνιση της νόσου. Έτσι οι μελέτες στην χημειοπροφύλαξη βασίζονται στην υπόθεση, ότι η διακοπή αυτής της μεταβολικής διαδικασίας, σε κάποιο από τα στάδια, θα αναστείλει ή θα ανατρέψει την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Οι προσπάθειες χημειοπροφύλαξης εστιάζουν κυρίως στην αρχική φάση και στην φάση προαγωγής της καρκινογένεσης. Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιείται στην παρατηρούμενη πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών. Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια και ιδιαίτερη βάση έχει δοθεί στην χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινόλων που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας. Οι πολυφαινόλες φαίνεται να δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την μετάσταση. (Bidlack και συν., 2000). Ο καρκίνος του ήπατος είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι αποτελεσματικές καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αμπέλου έχουν αντικαρκινική δράση.(Manjiner K., 2009 J. Nutr.) Ωστόσο, τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονται από τον καρπό του φυτού (κυρίως από σπόρους) ενώ καμία αναφορά δεν υπάρχει σχετικά με την πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους. Έχει βρεθεί ότι και τα εκχυλίσματα βόστρυχων είναι πλούσια σε φυτικές πολυφαινόλες οι οποίες είναι τα κύρια βιολογικά δραστικά συστατικά των σταφυλιών (Anastasiadi και συν., 2009). Κατά συνέπεια, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης σε καρκινικά κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα από στέμφυλα της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης είχαν σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση (Stagos 2005 Int J Mol Med; Stagos 2006 Mut Res; Stagos 2007 J agr Food Chem). Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση πολυφαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) στα καρκινικά ηπατοκύτταρα. Η απόπτωση θεωρείται σημαντικός μηχανισμός χημειοπροστασίας έναντι του καρκίνου. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στην δράση των κασπασών 3, 8 και 9 οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Τέλος εξετάστηκε *in vitro* η επίδραση του εκχυλίσματος στην αγγειογένεση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης ανέστειλε δόσοεξαρτώμενα την αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 με τιμή IC₅₀ 80 μg/ml. Η τιμή αυτή του IC₅₀ είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μέσα στα αποδεκτά όρια αντικαρκινικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων και κατά συνέπεια υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα διαθέτει πιθανή αντικαρκινική δράση. Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της επαγόμενης απόπτωσης έδειξαν ότι το εκχύλισμα επάγει απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στη συγκέντρωση των 100 μg/ml κατά περίπου 370%. Αυτό σημαίνει ότι η αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων από το εκχύλισμα οφείλεται τουλάχιστο εν μέρει στην πρόκληση απόπτωσης η οποία γενικά θεωρείται σημαντικός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αμπέλου από σπόρους (Dinicola και συν., 2010) και από φλούδα σταφυλιού (Hudson και συν., 2007) προκαλούσαν απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου και του προστάτη. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που δείχνει την πρόκληση απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα του

ήπατος. Γενικά, η πρόκληση απόπτωσης οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι όταν το εκχύλισμα επώαστηκε για 24 ώρες με τα HepG2 κύτταρα δεν υπήρξε ενεργοποίηση των κασπασών 3, 8 και 9 σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Ωστόσο, μετά από επώαση 12 ωρών υπήρξε αύξηση κατά 35 περίπου φορές στη δράση της κασπάσης 3, ενώ δεν αυξήθηκε η δράση των κασπασών 8 και 9. Αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση των κασπασών συμβαίνει σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 24 ωρών. Επίσης, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον πειράματα στα οποία θα προσδιοριστεί η δράση των κασπασών 8 και σε διάφορες χρονικές στιγμές πριν από τις 12 ώρες γιατί αυτές οι κασπάσες ενεργοποιούνται πριν από την κασπάση 3. Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη του εργαστηρίου βρέθηκε ότι το ίδιο εκχύλισμα βόστρυχου ανέστειλε την ευκαρυωτική τοποϊσομεράση I με τιμή IC₅₀ 2μg/ml (Καλλιαντά, 2010). Άρα η αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων από το εξεταζόμενο εκχύλισμα μπορεί να οφείλεται και στην αναστολή αυτού του ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων.

Προκειμένου να προσδιορίσουμε τα βιοδραστικά συστατικά του εκχυλίσματος στα οποία οφείλεται η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων εξετάσαμε την επίδραση πολυφαινολικών ενώσεων του, στην κυτταρική αύξηση των HepG2. Οι πολυφαινόλες αυτές ήταν οι εξής: κερκετίνη -3-ο-ραμνοσίδη, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, (+)-κατεχίνη, trans-ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, p-κουμαρικό οξύ. Για τη μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών ενώσεων επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις από 1 έως 200 Μμ. Η σειρά δραστηριότητας των εξεταζόμενων πολυφαινολών ήταν: trans-ρεσβερατρόλη = κερκετίνη > γαλλικό οξύ > (+)-κατεχίνη > κερκετίνη-3-Ο-ραμνοσίδη = καφεϊκό οξύ = κουμαρικό οξύ. Ήταν αξιοσημείωτο ότι τρεις από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες, η trans-ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ ήτανε δραστικές σε ιδιαίτερα μικρές συγκεντρώσεις οι οποίες μπορούν να επιτευχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από την κατανάλωση τροφών πλούσιες σε πολυφαινόλες.

Σε μια πρόσφατη μελέτη (Bin-Chuan Ji και συν, 2009) βρέθηκε ότι η χορήγηση γαλλικού οξέος σε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5-200Μμ), σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονος NCI-H460, οδήγησε στην μείωση της κυτταρικής αύξησης. Συντέλεσε στην επαγωγή της απόπτωσης διαμέσου αναστολής του κυτταρικού κύκλου (κυρίως τη φάση G2) και στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται άμεσα με τα μονοπάτια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και

σε άλλη μελέτη (Amico V και συν, 2009) από την επίδραση της κατεχίνης από εκχύλισμα σταφυλιού, ποικιλίας *Vitis Vinifera* της Σικελίας. Προσδιορίστηκε φασματομετρικά, με τη μέθοδο MTT, η επίδραση των κατεχινών και βρέθηκε πως προκαλούν αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων του στήθους MCF-7. Σε άλλη εργασία η κερκετίνη (Mertens-Talcott, 2005) επάγει την απόπτωση σε διάφορες καρκινικές σειρές προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές και DNA-fragmentation καθώς και ενεργοποίηση των κασπασών 3,8,9. Επίσης έχει προταθεί ότι η trans ρεσβερατρόλη, ακόμη και σε πολύ μικρή συγκέντρωση (0.1Mm), επάγει την απόπτωση μέσω της διακοπής της G1 και G2/M φάσης του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (Notas, 2006). Όσον αφορά το καφεϊκό οξύ, σε μικρές συγκεντρώσεις (1-2nm) αναστέλλει τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών -2 και -9 που εμπλέκονται στην διήθηση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, αναστέλλοντας τη δράση του NF-Kb (nuclear factor-kappa beta) στα ηπατικά Hep3B καρκινικά κύτταρα (Jin, 2005). Σαν αποτέλεσμα, η παρατηρούμενη ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος έναντι των καρκινικών κυττάρων οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στις περιεχόμενες πολυφαινόλες.

Τέλος όσον αφορά την *in vitro* εξέταση της αντι-αγγειογενετικής δράσης του εκχυλίσματος από βόστρυχο της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης, παρατηρήθηκε αναστολή σε συγκεντρώσεις 50 και 100 $\mu\text{g/ml}$ στον σχηματισμό σωλήνων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά περίπου 63% και 95% αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το εκχύλισμα έχει πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση. Επίσης, η αντι-αγγειογενετική δράση του εκχυλίσματος βόστρυχου οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στις πολυφαινόλες του εκχυλίσματος όπως η ρεσβερατρόλη αφού έχει αποδειχτεί ότι φυτικές πολυφαινόλες έχουν αντι-αγγειογενετική δράση. Θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να βρεθεί με ποιο μηχανισμό το εκχύλισμα αναστέλλει τον σχηματισμό των σωλήνων. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να εξεταστεί αν το εκχύλισμα μειώνει την έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF ή αν επηρεάζει την έκφραση και την δράση άλλων παραγόντων που είτε προάγουν είτε αναστέλλουν την αγγειογένεση. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση εκχυλίσματος από βόστρυχο αμπέλου. Σε μία άλλη μελέτη (Barthomeuf και συν., 2006), εκχύλισμα από γίγαρτα σταφυλιών είχε αναστείλει πλήρως τον σχηματισμό σωλήνων σε συγκέντρωση 25 $\mu\text{g/ml}$. Σε αυτή τη μελέτη η αντι-αγγειογενετική δράση είχε αποδοθεί κυρίως στη μείωση των επιπέδων της προ-αγγειογενετικής πρωτεΐνης VEGF και του λιπιδίου φωσφορική-1-σφιγγοσίνη. Σε άλλη μελέτη εκχυλίσματα από τη ράγα του σταφυλιού ανέστειλαν τον σχηματισμό σωληνίσκων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά

κύτταρα (HUVEC) σε συγκεντρώσεις 5mg/ml. Σε αυτή τη μελέτη, η αντι-αγγειογενετική δράση οφείλονταν κυρίως στη μείωση της έκφρασης της μεταλλοπρωτεΐνης 2 (MMP-2) (Liu M., 2010).

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη η οποία έδειξε ότι εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου μπορεί να αναστείλει την αύξηση καρκινικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα ηπατικών κυττάρων. Η παρατηρούμενη αναστολή οφείλεται εν μέρει στην πρόκληση απόπτωσης από το εκχύλισμα η οποία είναι εξαρτώμενη από την ενεργοποίηση των κασπασών. Επιπρόσθετα, οι περιεχόμενες πολυφαινόλες του εκχυλίσματος και ιδιαίτερα η κερκετίνη, η trans-ρεσβερατρόλη και το γαλλικό οξύ παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των ηπατοκυττάρων. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που δείχνει ότι εκχύλισμα βόστρυχο έχει πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση λόγω του ότι ανέστειλε το σχηματισμό σωληνίσκων από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει ακόμα περισσότερο την πιθανή αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος αφού η αναστολή της αγγειογένεσης θεωρείται σημαντικός αντικαρκινικός μηχανισμός. Κατά συνέπεια, πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για τη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούνται τόσο η ανασταλτική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχο στην αύξηση καρκινικών κυττάρων όσο και η αντι-αγγειογενετική.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ▶ **ACS.** Cancer Facts and figures, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3
- ▶ **Alitalo, K., and Carmeliet, P.** (2002) *Cancer Cell*, 1:219-227
- ▶ **Annabi B., Lachambre, M., Bousquet-Gagnon, N., Page M., et al.,** Green tea polyphenol (-) epigallocatechin 3- gallate inhibits MMP-2 Secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells, *Biochem. Biophys. Acta* 2002, 1542:209-220
- ▶ **Arts I., Jacobs D., Jr Gross, M., Harnack, L., Folsom, A.,** Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: The Iowa Women's Health Study (United States), *Cancer Causes Control* 2002, 13:373-382
- ▶ **Arts, C., Holmann, P., Bueno de Mesquita, H., Feskens, E., Kromhout, D.,** Dietary catechins and epithelial cancer incidence: The Zutphen elderly study, *Int. J. Cancer* 2001, 92: 298-302
- ▶ **Bagchi D., Sen, C., Bagchi M., Atalay M.,** Anti-angiogenic, antioxidant and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula, *Biochemistry (Moscow)* 2004, 69:75-80.
- ▶ **Bailey GS, Hendricks JD, Shelton DW, Nixon JE, Pawlowski NE:** Enhancement of anti-inflammation by the natural anticarcinogen indole-3-carbinol (1987) *J Natl Cancer Inst*, 78:931-934
- ▶ **Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E.** (1999) *J. Clin. Invest.*, 103:159-165
- ▶ **Bidlack WR, Omay ST., Meskin MS, Topham DKW,** 2000 *Phytochemicals as bioactive agents*, CRC Press
- ▶ **Bissel, DM., et al.,** Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver, *J. Clinical Invest.*, 79:801 (1987)
- ▶ **Bravo L.,** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 1998, 56:317-333
- ▶ **Cairns J:** Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, *Nature*, 255:197-200
- ▶ **Carcinogenesis,** 5:309-314
- ▶ **Carmeliet, P., Ng, Y-S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, VV., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, JC., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D' Amore, PA., and Shima, DT.** (1999) *Nat. Med.*, 5:495-502
- ▶ **Coultas, L., Chawegsaksohak, K., and Rossant, J.** (2005) *Nature*, 438:937-945
- ▶ **De Flora S, Ramel C:** Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) *Basic Life Sci*, 52:461-462
- ▶ **De Vries, C., Escobedo, JA., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, LT.** (1992) *Science*, 255:989-991
- ▶ **Dor, Y., Porat, R., and Keshet, E.,** (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280:C1367-C1374
- ▶ **Dvorak HF., Brown, LF., Detmar, L., and Dvorak, AM.** (1995) *Am. J. Pathol.*, 146:1029-1039
- ▶ **Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN:** Anti-carcinogenic activity of D-limonene during the initiation and promotion/promotion stages of DMBA induced rat mammalian carcinogenesis (1988) *Carcinogenesis*, 9:331-332

- ▶ **Ferrara, N., and Davis-Smyth, T.** (1997) *Endocr. Rev.*, 18:4-25
- ▶ **Ferrara, N., and Henzel, WJ.,** (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:851-858
- ▶ **Fika V:** Endometriosis of the cervix uteri incidence and hisogenesis,1986, Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki, 16:183-184
- ▶ **Folkman , J.,**(1990) *J. Natl. Cancer Inst.*,82, 4
- ▶ **Folkman , J.,**(1995) *N. Engl. J. Med.*, 333:1757-1763
- ▶ **Galland, F., Karamysheva, A., Pebusque, MJ., Borg, JP., Rottapel, R., Dubreuil, P., Rosnet, O., and Birnbaum, D.**(1993) *Oncogene*, 8:1233-1240
- ▶ **Gerber, H. P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998)** *J. Biol. Chem.*, 273:13313-13316
- ▶ **Gerber, H. P., Hillan, KJ., Ryan, AM., Kowalski, J., Keller, GA., Rangell, L., Wright, BD., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999)** *Development*, 126: 159-165
- ▶ **Gerber, H. P., McMurtrey A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, BA., Dixit V., and Ferrara, N. (1998)** *J. Biol. Chem.*, 273: 30366-30343
- ▶ **Gerhardt, H., and Betsholtz, C.**(2003) *Cell tissue Res.*,314:15-23
- ▶ **Goldbohm, R., Hertog M., Brants, H., van Poppel, G., van den Brandt, P.,** Consumption of black tea and cancer risk: A prospective cohort study, *J Natl.Cancer Inst.* 1996, 88:93-100
- ▶ **Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS:** Chemoprevention (1995) *CA Cancer J Clin*, 45:31-49
- ▶ **Hartman PE, Shankel DM:** Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules (1990) *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182
- ▶ **Hayakawa, S., Saeki, K., Sazuka, M., Suzuki Y., et al.,** Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 285:1102-1106
- ▶ **Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R and Yuspa SH:** Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters, 1983 *Nature*, 316:67-6
- ▶ **Hill DL, Grubbs CJ:** Retinoids and cancer prevention (1992) *Annu Rev Nutr*, 12:161-181
- ▶ **Houck, KA., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, DW. (1991)** *Mol. Endocrinol.*, 5:1806-1814
- ▶ **Houck, KA., Leung, DW., (1989) Rowland, AM., Winer, J., and Ferrara, N. (1992)** *J. Biochem.*, 267:26031-26037
- ▶ **Huang M-T, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH:** Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipooxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis (1991) *Cancer Res*, 51:813-819
- ▶ **Kawai, K., Tsuno, N., Kitayama, J., Okaji, Y., et al.,** Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115:186-191
- ▶ **Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Crowell JA, Lubet R, Sigman CC:** Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agent selection and short term clinical intervention trials (1994) *Cancer Res*, 54:2015-2024
- ▶ **Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubert RA, Crowell JA, Sigman CC:** Mechanistic considerations in chemoprotective drug development (1994) *J Cell Biochem (Suppl)* 20:1024
- ▶ **Kerbel R., Folkman J., 2002.** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer*

- ▶ **Key, T., Sharp, G., Appleby, P., Beral, V., et al.**, Soya Foods and breast cancer risk: A prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan, *Br. J. Cancer* 1999, 81:1248-1256
- ▶ **Keyt, BA., Berleau, LT., Nguyen, HV., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N.**, (1996) *J. Biol. Chem.*, 271:7788-7795
- ▶ **Kim, J., Liu L., Guo W., Meydani M.**, Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion, *J. Nutr. Biochem.* 2006, 17: 165-176
- ▶ **Kleinman, HK., et al.**, Basement membrane complexes with biological activity, *Biochemistry*, 25:312 (1986)
- ▶ **Kleinman, HK., et al.**, Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sakoma, *Biochemistry*, 21:6188 (1982)
- ▶ **Knert, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellovaara, M., et al.**, Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am J. Epidemiol.* 1997, 146:223-230
- ▶ **Komorowski J., Jankiewicz J., Stepień H., 2000.** Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (Bfgf), and soluble Interleukin-2 receptor (Sil-2R) concentrations in peripheral blood as markers of pituitary tumours. *Cytobios* 101:151-159

- ▶ **Kouretas Dimitrios** Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας.
- ▶ **Kris Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD, 2002** Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113:S71-88
- ▶ **Kubota Y et al.**, Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, *J. Cell Biol.*, 107:1589 (1988)
- ▶ **Kuenzig W, Chau J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W, Conney AH:** Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation (1984)
- ▶ **Lee, Y., Bone, N., Strege, A., Shanafelt, T., et al.**, VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *Blood* 2004, 104:788-794
- ▶ **Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N.(1989)** *Science*, 246: 1306-1309.
- ▶ **Li ML et al.**, Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84:136 (1987)
- ▶ **Manson M.**, Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular anti-infla, *Trends Mol. Med.* 2003, 9:11-18
- ▶ **Matthews, W., Jordan, CT., Gavin, M., Jenkins, NA., Copeland, NG., and Lemischka IR.** (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9026-9030
- ▶ **Mertens-Talcott, S., Percival, S.**, Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukaemia cells, *Cancer Lett.* 2005, 218:141-151

- ▶ **Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, NPH., Risau, W., and Ullrich, A.** (1993) *Cell*, 72: 835-846
- ▶ **Miller DR, Viage A, Aldaz CM, Conti CV and Slaga TJ** : Terminal anti-inflammatory resistant epidermal cells in mice undergoing two stage carcinogenesis, 1987, *Cancer Res*,47;1935-1940
- ▶ **Miller EC, Miller JA**: Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophils. In: *Bioactivation of foreign Compounds* (Anders MW, ed). New York: Academic Press, 1985:1-28
- ▶ **Mirvish SS**: Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: *Inhibition of tumor Induction and Development* (Zedek MS, Lipkin M, eds). New York: Plenum, 1981:101-126
- ▶ **Morse MA, Stoner GC**: Cancer chemoprevention: principles and prospects. (1993)*Carcinogenesis*, 14:1737-1746
- ▶ **Morton LW, Cacceta RRA, Puddey IB, Croft KD**, Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: ‘ relevance to cardiovascular disease ’ *Clin Exper Pharm Phys*, 27:152-159, 2000
- ▶ **Mouria M., Gukovskaya A., Jung, Y., Buechler, P., et al**, Food – derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis, *Int. J. Cancer* 2002, 98:761 -769
- ▶ **Muthuswamy, SK., et al.,** ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini, *Nat. Cell Biol.*, 3(9):785 (2001)
- ▶ **Nagy, J. A., Vasile, E., Feng, D., Sundberg, C., Brown, LF., Detmar, MJ., Lawitts, JA., Benjamin, L., Tan, X., Manseau, J., Dvorak,AM., and Dvorak, HF.**(2002) *J. Exp. Med.*, 196:1497-1506
- ▶ **Nakachi, K., Suemasu, K., Suga K., Takeo T., et al.,** Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients, *Jpn. J. Cancer Res* 1998,89:254-261
- ▶ **Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Portorak, Z.**(1999) *FASEB J.*, 13:9-22
- ▶ **Nguyen, T., Tran, E., Do P., et al.,** The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells, *Carcinogenesis* 2004, 25:647-659
- ▶ **Nishikawa, T., Nakajima, T., Moriguchi, M., Jo, M., et al.,** A green tea polyphenol ,epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins, *J. Hepatol.* 2006,44:1074-1082
- ▶ **Page JL., et al.,** Gene expression profiling of extracellular matrix as an effector of human hepatocyte phenotype in primary cell culture, *Toxicological Sciences*, 97(2):384 (2007)
- ▶ **Pajusol, K., Aplelikova, O., Kohronen, J., Kaipainen, A., Petrovaara, L., Alitalo, R., and Alitalo, K** .(1992) *Cancer Res.*, 52:5738-5743
- ▶ **Park, JE., Keller, HA., and Ferrara, N.** (1993) *Mol. Biol. Cell*, 4:1317-1326
- ▶ **Passaniti A et al.,** A simple quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor, *Lab Invest.*, 67:519 (1992)
- ▶ **Pegg AE**: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy (1988) *Cancer Res*, 48:759-774
- ▶ **Pence BC, Buddingh F, Yang SP**: Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol (1986) *J Natl Cancer Inst*, 77:269-276

- ▶ **Potter VR:** A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver, 1981, *Carcinogenesis*, 2:1375-1379
- ▶ **Potter VR:** Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: an examination of the Solt-Farber protocol, 1984, *Cancer Res*, 44: 2733-2736
- ▶ **Prewett, M., Huber J., Li Y., Santiago A., O'Connor W., King K., Overholser J., Hooper A., Pytowski B., Witte L., Bohlen P., Hicklin DJ** 1999. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase I) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Research* 59: 5209-5218
- ▶ **Ramos S., Alia M., Bravo L., Goya, L.**, Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2), *J. Agric. Food Chem.* 2005,53:1271-1280
- ▶ **Ramos S.**, Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *J. Nutr. Biochem.* 2007, 18:427-442
- ▶ **Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G:** Dose related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a non steroidal anti-inflammatory drug during different stages of rat colon tumor development (1987) *Cancer Res*, 47:5340-5346
- ▶ **Russo A., Acquaviva R., Campisi, A., Sorrenti V., et al.**, Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors, *Cell Biol. Toxicol.* 2000, 16: 91-98
- ▶ **Senger, DR., Galli, SJ., Dvorak, AM., Perruzzi, CA., Harvey, VS., and Dvorak HF** (1983) *Science*, 219:983-985
- ▶ **Shenoy NR, Choughuley ASU:** Inhibitory effect of diet related sulfhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines (1992) *Cancer Lett*, 65: 227-232
- ▶ **Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushine, H., and Sato, M.**(1990) *Oncogene*, 5:519-524
- ▶ **Stepien HM., Kolomecki K., Pasiaka Z., Komorowski J., Stepien T., Kuzdak K.**, 2002. Angiogenesis of endocrine gland tumours- new molecular targets in diagnostics and therapy. *European Journal Of Endocrinology* 148:143-151
- ▶ **Surh, Y-J.**, Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, *Nat.Rev. Cancer* 2003, 3:768-780
- ▶ **Terman, BI., Carrion, ME., Kovacs, E., Rasmussen, BA., Eddy, R., and Shows, TB.** (1991) *Oncogene*, 6:1677-1683
- ▶ **Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, JC., and Abraham, JA** (1991) *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954
- ▶ **Troll W, Kennedy AR:** Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents (1998) *Cancer Res*, 49:499-502
- ▶ **Trosko JE and Chang CC:** Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, *Toxicol Lett*, 49:283-295
- ▶ **Trosko JE, Chang CC and Medkalf A:** Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, 1983, *Cancer Invest*, 1:511-526
- ▶ **Tsubono, Y., Nishino, Y., Komatsu, S., Hiesh, C., et al.**, Green tea and the risk of gastric cancer in Japan, *N. Engl. J. Med.* 2001,344:632-66
- ▶ **Vukicevic, S., et al.**, Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components ,

- ▶ **Wainfain E Poirier A** :Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) *Cancer Res*, 52:2071-2077
- ▶ **Watson W., Cai J., Jones D.**, Diet nd apoptosis, *Annu. Rev. Nutr.* 2000, 108 :153-164
- ▶ **Watteberg LW, Loub WD**: Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles (1978) *Cancer Res*, 38:1410-1413
- ▶ **Wattenberg LW**: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45:1-8
- ▶ **Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel M., Daniel H.**, Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells, *Cancer Res.* 2000, 60 :3823-3831
- ▶ **Whitfield JF**: Calcium: driver of cell cycles, trigger of differentiation, and killer of cells. In *Cellular and Molecular Targets for chemoprevention*(Steele VE, Stoner GD, Boone CW, Kelloff GJ, eds).Boca Raton, FL: CRC Press, 1992:257-311
- ▶ **Yamakawa S., Asaia T., Uchidaa, T., Matsukawab, M., et al.**, (2) Epigallocatechin galate inhibits membrane- type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis, *Cancer Lett.* 2004, 210:47-55
- ▶ **Yang, C., Landau J., Newmark, H.**, Inhibition of carcinogenesis by ietary polyphenolic compounds, *Annu. Rev. Nutr* :2001, 21 :381-397
- ▶ **Yokoyama, M., Noguchi, M., Nakao, Y., Pater, A., Iwasaka, T.**, The tea polyphenol, (-) epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines, *Gynecol. Oncol.* 2004, 92:197-204
- ▶ **Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS**: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1 /2 cells (1991) *Carcinogenesis*,12:2109-2114
- ▶ **Manjinder K, Chapla A, Rajesh A** : Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of grape seed extract and other grape-based products, *J. Nutr*: 2009

- ▶ **Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ, Haroutounian SA.** *J Agric Food Chem.* 2009 Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification by products.
- ▶ **Dinicola S, Cucina A, Pasqualato A, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqua G, Santamaria** Apoptosis-inducing factor and caspase-dependent apoptotic pathways triggered by different grape seed extracts on human colon cancer cell line Caco-2.

- ▶ **Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, Nunez NP, Wang TT, Young HA, Arany P, Green JE.** Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms 2007.

- ▶ Liu M, Liu RH, Song BB, Li CF, Lin LQ, Zhang CP, Zhao JL, Liu JR. Antiangiogenetic effects of 4 varieties of grapes in vitro. *J Food Sci.* 2010 Aug 1;75(6):T99-104.

