



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΑΡΑΓΚΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

«Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων ρόκας (*Eruca sativa*) στην ανάπτυξη και απόπτωση ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων»

« Study of the effect of *Eruca sativa* extracts on the growth and apoptosis of human cancer cells»

**Τίτλος πτυχιακής εργασίας:** Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων  
ρόκας στην ανάπτυξη και απόπτωση ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων

**Όνομα Φοιτητή:** Μαραγκού Αικατερίνη

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:** Λιαδάκη Καλλιόπη

**Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος**

**Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή :**

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας  
του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας  
Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

**Καρπούζας Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής  
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κα Λιαδάκη Καλλιόπη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο, με το οποίο επιθυμώ να ασχοληθώ ξανά στο μέλλον, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε καθώς και για την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη της τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας όσο κατά την συγγραφή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Παπαδοπούλου Καλλιόπη καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και ιδιαίτερα την κα Κροκιδά Αφροδίτη και την κα Σκιαδά Βασιλική, τόσο για την παροχή των εκχυλισμάτων ρόκας όσο και για τις γνώσεις και τις συμβουλές τους κατά την εκπόνηση και συγγραφή της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
SUMMARY .....	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1. Καρκινογένεση .....	9
1.1. Γενικά .....	9
1.2. Πολυσταδιακό Μοντέλο Καρκινογένεσης .....	10
1.3. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων .....	11
1.4. Χημειοπροφύλαξη .....	16
2. Απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) .....	23
2.1. Γενικά .....	23
2.2. Ομοιόσταση ιστών .....	25
2.3. Είδη Απόπτωσης .....	25
3. Το φυτό ρόκα ( <i>Eruca sativa</i> ) .....	27
4. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών .....	30
4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων .....	36
4.3. Βιολογικές δράσεις των γλυκοσινολικών οξέων στα φυτά και στον άνθρωπο .....	39
4.4. Αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων .....	40
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	44
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	45
1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά .....	45
2. Φυτικό Υλικό .....	46
2.1. Καλλιέργεια .....	46
2.1.1. Καλλιεργητικές φροντίδες .....	46
2.1.2. Πειραματικό Σχέδιο .....	46
2.1.3. Δειγματοληψία – Επεξεργασία Δείγματος .....	47
2.2. Απομόνωση εκχυλισμάτων γλυκοσινολικών οξέων .....	47
3. Καρκινικές κυτταρικές σειρές .....	50
3.1. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) .....	50
3.2. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG <sub>2</sub> ) .....	51
3.3. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (ορμονοεξαρτώμενα) (MCF-7) .....	52
3.4. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (ορμονοανεξάρτητα) (MDA-MB-231) .....	54
3.5. Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια .....	55

3.6. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας .....	56
3.6.1. Πάγωμα κυττάρων .....	57
3.6.2. Ξεπάγωμα κυττάρων .....	58
4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου .....	58
5. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης με τη μέθοδο ΧΤΤ .....	60
5.1. Αρχή της μεθόδου .....	60
5.2. Προσδιορισμός της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο ΧΤΤ .....	62
5.3. Προσδιορισμός της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa) ύστερα από διαφορετικούς χρόνους επώασης με το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N <sup>+</sup> /S <sup>+</sup> .....	65
5.4. Προσδιορισμός της επίδρασης του αναστολέα της κασπάσης 3 στην δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της μεταχείρισης N <sup>+</sup> /S <sup>+</sup> σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) .....	65
6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων .....	66
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοσινολικά οξέα αποτελούν μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών, που απαντώνται κυρίως στην οικογένεια Brassicaceae και πρόκειται για ενώσεις που προέρχονται από αμινοξέα. Τα προϊόντα υδρόλυσης των διαφόρων τύπων γλυκοσινολικών οξέων συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού και παράλληλα έχουν χημειοπροστατευτικές δράσεις. Δύο από τα στοιχεία θρέψης των φυτών που επηρεάζουν τη σύσταση και τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα φυτά της οικογένειας Brassicaceae είναι το άζωτο και το θείο. Το φυτό *Eruca sativa* (ρόκα), που ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae, προέρχεται από την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου και καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό.

Στην παρούσα μελέτη φυτά ρόκας καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες λίπανσης αζώτου και θείου. Ακολούθησε απομόνωση εκχυλισμάτων από τα φύλλα και τις ρίζες των φυτών της κάθε μεταχείρισης και προσδιορίστηκε η σύσταση και η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων σε κάθε εκχύλισμα. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η δράση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξη ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας, ανθρωπίνων ηπατικών καρκινικών κυττάρων καθώς και ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων μαστού (ορμονοεξαρτώμενων και ορμονοανεξάρτητων). Με τη χρήση της βιοδοκιμής ΧΤΤ, που βασίζεται στη δραστηριότητα μιτοχονδριακών ενζύμων, βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα επηρεάζουν την ανάπτυξη των διαφορετικών κυττάρων, σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με τον ιστό (φύλλα, ρίζες) και την μεταχείριση. Τα περισσότερα εκχυλίσματα εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση, ενάντι όλων των κυττάρων, ενώ μόνο δύο εκχυλίσματα (αυτά των φύλλων της μεταχείρισης απουσία αζώτου και θείου και των ριζών της μεταχείρισης παρουσία αζώτου και θείου) δεν οδήγησαν σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Η ανάλυση της σύστασης των εκχυλισμάτων και της περιεκτικότητάς τους σε ολικά και μεμονωμένα γλυκοσινολικά οξέα, ήταν αρκετή για να εξηγήσει την δραστηριότητά τους, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις. Τέλος το πιο δραστικό εκχύλισμα, που προέρχεται από φύλλα ρόκας που μεγαλώνουν παρουσία κανονικής αζωτούζας και θειούχου λίπανσης, μελετήθηκε περαιτέρω και δείχθηκε ότι ασκεί την κυτταροτοξική του δράση, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3 και επαγωγής της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa.

## SUMMARY

Glycosinolates compose a class of secondary metabolites, which are found especially in the members of the Brassicaceae family. Glycosinolates originate from aminoacids and the products of their hydrolysis are important for the plant's defense and offer chemoprevention to humans. Nitrogen and sulfur are two major nutrients, which influence the composition and the concentration of glycosinolates in the plants of the Brassicaceae family. *Eruca sativa* belongs to Brassicaceae family, originates from the Mediterranean region, and is consumed as a leafy vegetable.

In the present study, rocket (*Eruca sativa*) plants were cultivated in different conditions of nitrogen and sulfur lubrication and glycosinolate extracts were obtained from different tissues (leaves and roots) of the plants of the various treatments. These extracts were examined for their ability to influence the growth of human cervix cancer cells (HeLa), human liver cancer cells (HepG<sub>2</sub>) and human breast cancer cells (MCF7/hormone dependent cells and MDA-MB-231/hormone independent cells). Using the XTT assay, which relies on mitochondrial enzymatic activity, we demonstrate that the various extracts affected the growth of the tested cancer cells to a different extent, depending on the tissue (leaf, root) and the treatment. The majority of the extracts exhibited strong cytotoxic action towards all cell lines, but we also identified the cases of two extracts (those of leaves in the treatment of absence of N and S and those of roots in the treatment of presence of N and S) which showed minimum inhibition of cellular growth. The composition of the extracts in total and individual glucosinolates was sufficient in order to explain the reported activity, in some cases, but not in all. Finally, the effect of the strongest cytotoxic extract (that of the leaves of the theratment in the presence of N and S) was further studied in HeLa cells and was shown to activate caspace 3 and induce apoptosis.



## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1. Καρκινογένεση**

#### **1.1. Γενικά**

Στην εποχή μας ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα των αναπτυγμένων χωρών. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά στη συμπεριφορά τους και στην απόκριση των ασθενών στις θεραπείες.

Η πλειονότητα των ανθρωπίνων καρκίνων δεν μπορεί να ερμηνευθεί βάσει μενδελικών (μονογονιδιακών) προτύπων κληρονόμησης. Σε κυτταρικό επίπεδο ο καρκίνος είναι κατά βάση μια γενετική ασθένεια. Κάθε φυσιολογικό ανθρώπινο κύτταρο χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο και αυστηρά ρυθμιζόμενο γενετικό πρόγραμμα, που ελέγχει τη φυσιολογική κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από διαταραχή αυτού του φυσιολογικού ρυθμιστικού προτύπου, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό, γεγονότα που χαρακτηρίζουν τη δημιουργία ενός όγκου, καλοήθους ή κακοήθους. Οι όγκοι σχηματίζουν ένα δικό τους αγγειακό δίκτυο, το οποίο είναι πιο πυκνό σε σχέση με το φυσιολογικό. Συχνά, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που καλείται μετάσταση.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης προϋποθέτει τη συσσώρευση πολλαπλών και διαδοχικών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου. Τρεις είναι οι βασικές κατηγορίες επιβλαβών παραγόντων που δρουν προς αυτήν την κατεύθυνση: η επίδραση συγκεκριμένων χημικών ουσιών, η επίδραση ακτινοβολιών και η μόλυνση από συγκεκριμένους ιούς, που χαρακτηρίζονται ως ογκογόνοι. Για τη μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό, συνήθως επιδρούν περισσότεροι από έναν παράγοντες, που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες σε συνδυασμό ή διαδοχικά.

## 1.2. Πολυσταδιακό Μοντέλο Καρκινογένεσης

Σύμφωνα με το βασικό μοντέλο της καρκινογένεσης, η κακοήθης εξαλλαγή συνιστά μια πολυσταδιακή διαδικασία: η έναρξη της δημιουργίας ενός όγκου απαιτεί μια σειρά βημάτων που ακολουθούνται από επιπρόσθετες αλλαγές, ενισχύοντας το ογκογόνο υπόβαθρο. Στη συνέχεια, η εξέλιξη του όγκου (tumor progression) καθορίζεται από την επιλογή των καρκινικών κυττάρων που διαθέτουν επιθετικότερο δυναμικό. Πολλοί διαφορετικοί τύποι γεγονότων μπορούν να συμβάλλουν στη διαδικασία αυτή σε μοριακό επίπεδο. Οι δύο σημαντικότεροι τύποι αλλαγών που συμβαίνουν στο γονιδίωμα κατά την κακοήθη εξαλλαγή είναι η συσσώρευση σωματικών αλλαγών και η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας (Bishop & Weinberg, 1996). Η σχετική σημασία της συνεισφοράς τους στην καρκινογένεση εξακολουθεί να αποτελεί θέμα έντονης επιστημονικής συζήτησης. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα φέρουν αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Κάποιες από τις πρώιμες μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα σε γονίδια μεταλλάκτες (mutator genes). Η απενεργοποίηση αυτών των γονιδίων μειώνει τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και επομένως ο βαθμός μεταλλαξιγένεσης αυξάνεται. Η γενετική αστάθεια αντικατοπτρίζεται σε αλλαγές στον αριθμό των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα μικρών διπλασιασμών ή ελλειμμάτων, μετατοπίσεων χρωμοσωμικού υλικού από ένα χρωμόσωμα σε ένα άλλο ή ακόμη και αλλαγών που επηρεάζουν ολόκληρα χρωμοσώματα. Η αστάθεια σε επίπεδο χρωμοσωμάτων μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς που δρουν κατά το διαχωρισμό τους στη μίτωση.

Η ύπαρξη διαφορετικών μεταλλάξεων σε ένα κυτταρικό πληθυσμό προσφέρει την ευκαιρία επιλογής κυττάρων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Στην περίπτωση του καρκίνου, μια μετάλλαξη που αυξάνει το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου του προσδίδει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα. Ένα κύτταρο που διαιρείται συχνότερα, πιθανόν επειδή δεν υπόκειται στους συνήθεις περιορισμούς της αύξησης, παράγει περισσότερους απογόνους. Σε κάθε στάδιο της καρκινογένεσης σε έναν ιστό, επιλέγονται από τον κυτταρικό πληθυσμό εκείνα τα κύτταρα που μπορούν να αναπτυχθούν πιο επιθετικά, δηλαδή εκείνα που αρχικά πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα, ενώ αργότερα μπορούν να μεταναστεύουν δημιουργώντας αποικίες σε νέες θέσεις. Η σημερινή άποψη για την καρκινογένεση είναι ότι εξελίσσεται με πολλαπλούς κύκλους μετάλλαξης και επιλογής: ο αυξημένος ρυθμός μετάλλαξης ευθύνεται για τη δημιουργία κυττάρων με διαφορετικές ικανότητες

πολλαπλασιασμού, από τα οποία στη συνέχεια επιλέγονται τα κύτταρα που διαθέτουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Συγκρίνοντας τα καρκινικά κύτταρα με τα φυσιολογικά, μπορούμε να προσδιορίσουμε γονίδια που έχουν διαφοροποιηθεί με μετάλλαξη. Από αυτά τα γονίδια, εκείνα που έχουν άμεση επίδραση στη δημιουργία καρκίνου μπορούν να διακριθούν σε ογκογονίδια (oncogenes) που περιλαμβάνουν γονίδια των οποίων η λειτουργία ενεργοποιείται από μια μετάλλαξη και συμβάλλει στην ογκογένεση και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressors), που περιλαμβάνουν γονίδια των οποίων η φυσιολογική λειτουργία παρεμποδίζει την ογκογένεση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος εκδηλώνεται εξαιτίας της συσσώρευσης μιας ποικιλίας μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο, οι οποίες ενεργοποιούν τα ογκογονίδια και/ή απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

### **1.3. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων**

Τα τρία είδη των αλλαγών που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο, όταν γίνεται ογκογόνο είναι τα ακόλουθα:

A) **Η αθανατοποίηση** (immortalization) είναι η ικανότητα για συνεχή και επ'άοριστον ανάπτυξη, χωρίς απαραίτητα να συμβαίνουν άλλες φαινοτυπικές αλλαγές.

B) **Ο μετασχηματισμός** (transformation) περιγράφει τη διαφυγή από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης. Για παράδειγμα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων που φυσιολογικά θα ήταν απαραίτητοι για την επιβίωσή τους.

Γ) **Η μετάσταση** (metastasis) περιγράφει το στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ικανότητα έκτοπης ανάπτυξης, μπορούν δηλαδή να εισβάλλουν σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν από τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες).

Όλα τα παραπάνω μπορούν να επιτευχθούν εξαιτίας της εκδήλωσης έξι βασικών αλλαγών στην φυσιολογία των καρκινικών κυττάρων (Hanahan & Weinberg, 2000) που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

### **1) Αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες**

Τα φυσιολογικά κύτταρα πρέπει να λάβουν εξωτερικά σήματα από αυξητικούς παράγοντες για να προχωρήσουν στη μίτωση. Αυτά τα σήματα μεταφέρονται μέσα στα κύτταρα με τη βοήθεια διαμεμβρανικών υποδοχέων ειδικών για κάθε παράγοντα. Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κανένας τύπος φυσιολογικών κυττάρων που να μπορεί να πολλαπλασιαστεί απουσία τέτοιων σημάτων.

Πολλά από τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν τους αυξητικούς παράγοντες, που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό τους. Οι παράγοντες αυτοί απελευθερώνονται στο περιβάλλον και στη συνέχεια δεσμεύονται σε υποδοχείς, που εντοπίζονται στο ίδιο το καρκινικό κύτταρο (αυτοκρινής διέγερση του πολλαπλασιασμού) οπότε το κύτταρο παίρνει το σήμα να προχωρήσει στη μίτωση (Fedi et al, 1997). Έτσι λοιπόν, οι όγκοι αποκτούν μια ανεξαρτησία από το κυτταρικό περιβάλλον και η ανεξαρτησία αυτή διακόπτει έναν κρίσιμης σημασίας ομοιοστατικό μηχανισμό που φυσιολογικά λειτουργεί για να εξασφαλίσει την κανονική συμπεριφορά διαφόρων τύπων κυττάρων μέσα στον ιστό.

### **2) Απευαισθητοποίηση των σημάτων που αναστέλλουν την ανάπτυξη**

Τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε ένα φυσιολογικό ιστό διατηρούν την κυτταρική ηρεμία και ομοιόσταση, αναστέλλοντας την κυτταρική αύξηση με δύο μηχανισμούς:

A) Προωθώντας την είσοδο των κυττάρων στη φάση G<sub>0</sub> του κυτταρικού κύκλου, όπου τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται και

B) Επάγοντας την είσοδό τους σε μετα-μίτωτικές φάσεις

Στα καρκινικά κύτταρα δεν λαμβάνουν χώρα αυτές οι διεργασίες οπότε και παρατηρείται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους.

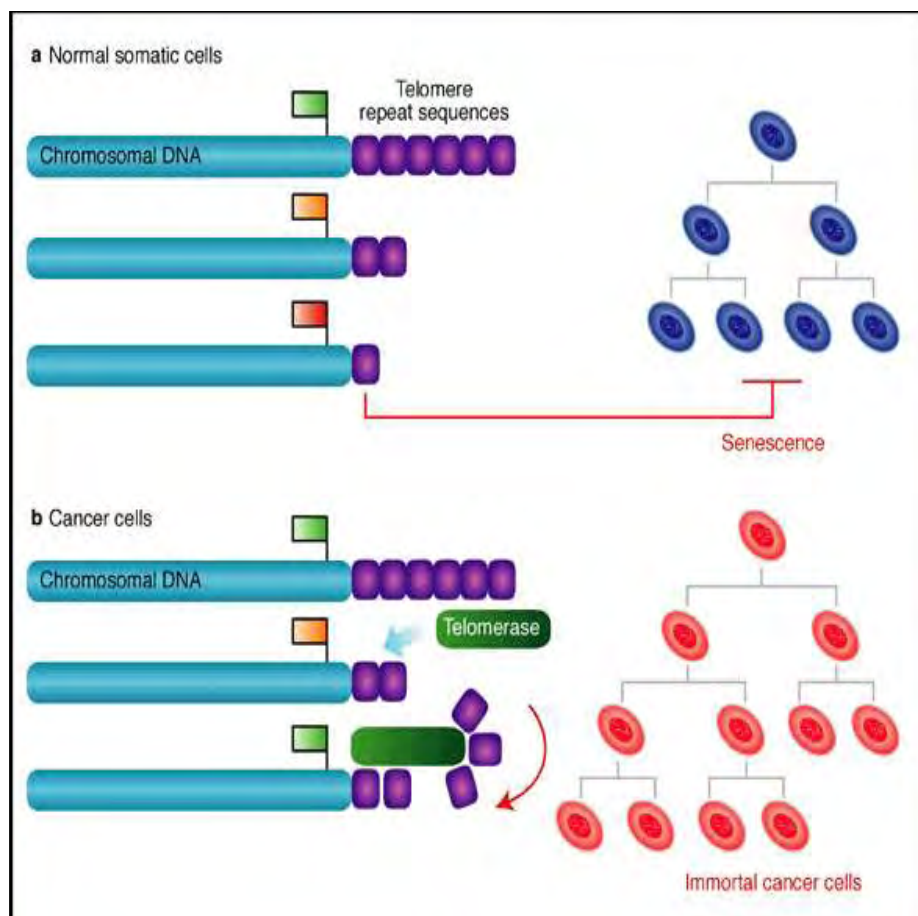
### **3) Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού**

Τα κύτταρα των θηλαστικών μπορούν να επιτελέσουν ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων προτού να πεθάνουν. Αυτός ο αριθμός δεν ξεπερνά τις 60-70 διαιρέσεις. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα έχουν απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων, γεγονός που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και διατήρηση του όγκου. Στα άκρα των χρωμοσωμάτων εντοπίζονται τα τελομερή, περιοχές επαναλαμβανόμενου DNA, οι οποίες είναι απαραίτητες για την προστασία των περιοχών του χρωμοσώματος που καλούνται μεσομερή. Τα μεσομερή

περιέχουν σημαντικές γενετικές πληροφορίες, που καθιστούν το χρωμόσωμα βιολογικά ενεργό. Αντιθέτως τα τελομερή δεν περιέχουν σημαντικές γενετικές πληροφορίες, ωστόσο διαθέτουν τέτοια δομή που επιτρέπει την προσκόλληση πρωτεϊνών που «δένουν» τη διπλή έλικα του DNA στην κάθε άκρη της. Λόγω των πρωτεϊνικών προστατευτικών επιστρώσεων στα άκρα, η φθορά πλέον των χρωμοσωμάτων σε μήκος συμβαίνει σχεδόν μόνο κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη διαδικασία της μίτωσης, όπου οι έλικες των χρωμοσωμάτων ξεδιπλώνουν εντελώς και κάθε χρωμόσωμα χωρίζεται στα δύο, ώστε το κάθε κομμάτι να αποτελέσει το καλούπι για το σχηματισμό του νέου χρωμοσώματος, εν δυνάμει πανομοιότυπου με το αρχικό, για το κάθε νέο κύτταρο. Στη διαδικασία αυτή, στα άκρα των χρωμοσωμάτων συνήθως αποκόπτεται μέρος από το γενετικό υλικό. Αυτή είναι μια «παρενέργεια» που δε μπορεί να αποφευχθεί σε γενικό κανόνα, καθώς οι μηχανισμοί που παρέχουν τα συνήθη ένζυμα για την αντιγραφή της πληροφορίας δε δίνουν τη δυνατότητα για αντιγραφή του γενετικού υλικού στις άκρες των χρωμοσωμάτων. Το υλικό του DNA που αποκόπτεται είναι, τουλάχιστο στις πρώτες διαιρέσεις αναπαραγωγής, μέρος του τελομερούς, το οποίο ολοένα μικραίνει σε κάθε κυτταρική διαίρεση.

Αν το μήκος των τελομερών δεν αποκατασταθεί με κάποιο μηχανισμό επιδιόρθωσης, η κάθε κυτταρική διαίρεση καταναλώνει τα τελομερή και στο τέλος αποκόπτεται πλέον από το χρωμόσωμα η σημαντική πληροφορία του μεσομερούς, με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται προς απόπτωση. Ο μηχανισμός που προστατεύει το μήκος των τελομερών παρέχεται από το ένζυμο τελομεράση, που έχει την ικανότητα να συμπληρώνει το τελομερές σε μήκος με την προσθήκη εξανουκλεοτιδικών επαναλήψεων στα άκρα του τελομερούς DNA (Εικόνα 1) (Bryan & Cech, 1999). Εάν η τελομεράση διατίθεται σε ικανές ποσότητες όταν γίνονται οι κυτταρικές διαιρέσεις δίνεται η δυνατότητα στα τελομερή να αποκαθίστανται πλήρως σε μήκος και το κύτταρο μπορεί και παραμένει έτσι βιολογικά ενεργό για πάντα. Η διατήρηση των τελομερών είναι προφανής σε όλους τους τύπους καρκινικών κυττάρων (Shay & Bacchetti, 1997). Το 85%-90% αυτών το επιτυγχάνει απορρυθμίζοντας την έκφραση του ενζύμου τελομεράση, ενώ το υπόλοιπο 10%-15%, έχει εφεύρει ένα τρόπο ενεργοποίησης ενός μηχανισμού που ονομάζεται ALT, και ο οποίος διατηρεί τα τελομερή μέσα από ανασχηματισμούς βάσεων στο εσωτερικό των χρωμοσωμάτων (Bryan et al., 1995). Με τον έναν ή τον άλλο τρόπο τα τελομερή καταφέρνουν να διατηρούν το μήκος τους πάνω από το κρίσιμο σημείο κάτι που επιτρέπει στα κύτταρα απεριόριστους πολλαπλασιασμούς. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί φαίνεται να είναι ισχυρά

κατεσταλμένοι στα φυσιολογικά κύτταρα έτσι ώστε να μην υπάρχει η δυνατότητα απεριόριστων πολλαπλασιασμών (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Σύνθεση τελομερών σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα (Keith et al., 2002)

#### **4) Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης)**

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Η αποτυχία των καρκινικών κυττάρων να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) επηρεάζει σημαντικά τόσο την ανάπτυξη ενός όγκου, όσο και την επιβίωση και αύξηση των μεταστατικών κυττάρων σε απομακρυσμένες θέσεις. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα δεν οδηγούνται σε απόπτωση μετά τη δημιουργία βλαβών στο γενετικό τους υλικό, γεγονός που συμβάλλει στην ανθεκτικότητα τους στην ακτινοβολία και στη χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων που προκαλούν βλάβες στο DNA. Παράλληλα με την αποφυγή της απόπτωσης, τα καρκινικά

κύτταρα διαθέτουν απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής του γενετικού τους υλικού, καθώς εκφράζουν την τελομεράση, ένζυμο απαραίτητο για τη διατήρηση των άκρων των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων (Cooper & Hausmann, 2011).

### **5) Διατήρηση της αγγειογένεσης**

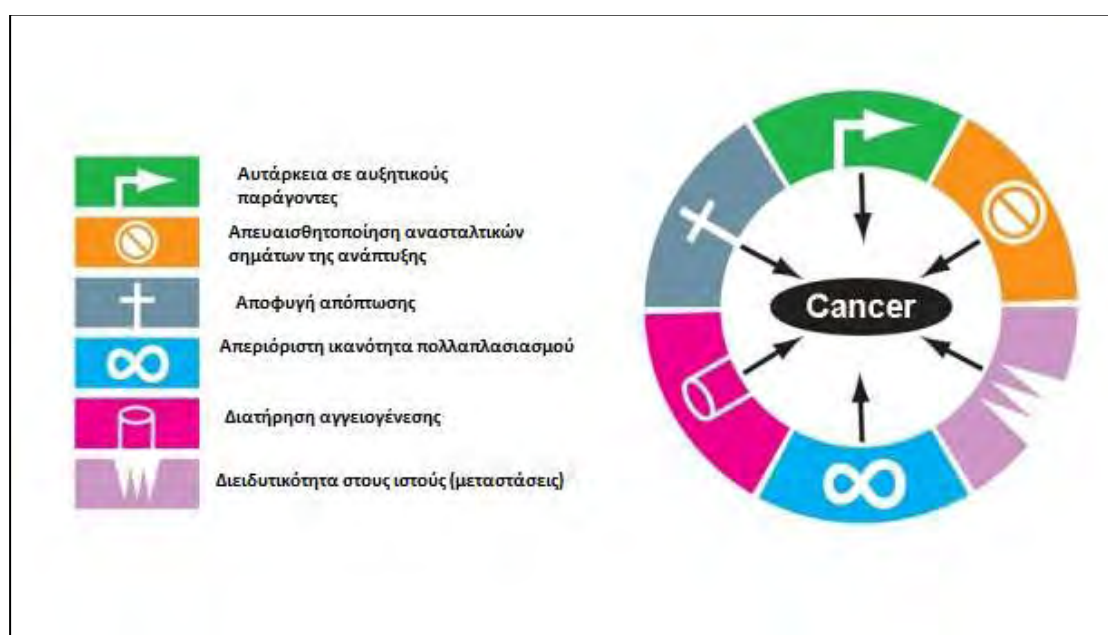
Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από τα αγγεία είναι πολύ σημαντικά για τη λειτουργία και την επιβίωση του κυττάρου αναγκάζοντας το σύνολο σχεδόν των κυττάρων ενός ιστού να μένει μέσα σε 100μm ενός τριχοειδούς αιμοφόρου αγγείου. Κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης αυτή η εγγύτητα διασφαλίζει τη συντονισμένη και ισότιμη ανάπτυξη των τριχοειδών και του παρεγχύματος. Μόλις σχηματιστεί ο ιστός η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων (διαδικασία αγγειογένεσης) είναι παροδική και αυστηρά ρυθμισμένη (Carmeliet, 2000). Εξαιτίας αυτής της εξάρτησης από τα γειτονικά τριχοειδή θα φαινόταν πιθανό τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μέσα σε έναν ιστό να έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν αιμοφόρα αγγεία. Αλλά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Τα κύτταρα με παρεκκλίνουσα πολλαπλασιαστική συμπεριφορά αρχικά δεν έχουν την ικανότητα της αγγειογένεσης παρεμποδίζοντας έτσι την δυνατότητα τους για επέκταση. Προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν κάποιες νεοπλασίες που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο πρέπει να αναπτύξουν την ικανότητα της αγγειογένεσης (Bouck et al., 1996; Hanahan & Folkman, 1996; Folkman, 1997). Υπάρχουν ενδείξεις ότι διαφορετικοί τύποι καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιούν ξεχωριστούς τρόπους ενεργοποίησης της αγγειογένεσης. Επιπλέον η καρκινική αγγειογένεση μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του καρκινικού όγκου, τη θέση του, καθώς και με τα αγγειογενετικά και αντι-αγγειογενετικά μόρια που παράγουν τόσο τα ίδια τα κύτταρα του όγκου όσο και τα κύτταρα του στρώματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η εξωκυττάρια ύλη (Fukumura, et al 1998).

### **6) Διεσδυτικότητα σε ιστούς (μεταστάσεις)**

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου, κύτταρα από τον αρχικό όγκο μπορούν να ταξιδέψουν σε πιο μακρινά σημεία και να δημιουργήσουν μια νέα αποικία. Οι απομακρυσμένες αυτές εντοπίσεις των καρκινικών κυττάρων ονομάζονται μεταστάσεις και είναι η αιτία για το 90% των θανάτων από καρκίνο (Sporn, 1996). Η ικανότητα για διεσδυση και μετάσταση επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να δραπετεύσουν από τον αρχικό όγκο και να

αποικίσουν νέες περιοχές του σώματος στις οποίες στην αρχή τουλάχιστον ο χώρος και τα θρεπτικά συστατικά δεν είναι περιορισμένα.

Η διείσδυση και η μετάσταση είναι δύο εξαιρετικά πολύπλοκες διαδικασίες και ο γενετικός και βιοχημικός ορισμός τους δεν είναι απολύτως κατανοητοί. Επίσης οι δύο αυτές ιδιότητες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους σε σημείο που να ορίζονται ως μία, λόγω της κοινής στρατηγικής δράσης που χρησιμοποιούν. Αρκετά είδη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσδεση των κυττάρων μέσα σ' έναν ιστό είναι διαφοροποιημένα στα καρκινικά κύτταρα. Στις πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνονται οι CAMs (cell-cell adhesion molecules) και οι ιντεγκρίνες που ενώνουν τα κύτταρα με την εξωκυττάρια ύλη.



**Εικόνα 2:** Χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

#### 1.4. Χημειοπροφύλαξη

Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιήθηκε το 1976 από τον Michael Sporn για να περιγράψει την αναστολή ή αναστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χρήση μη κυτταροτοξικών θρεπτικών ουσιών ή θρεπτικών ενώσεων που προστατεύουν ενάντια στην ανάπτυξη των κακοήθων κυττάρων (Sporn, 2000, Tsao et al., 2004). Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι το 80% του συνόλου των καρκίνων οφείλεται στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα όπως διατροφή, κάπνισμα, εργασιακό περιβάλλον (Parsa, 2012; Higginson et al., 1977; Doll et al., 1981). Τα τελευταία χρόνια αυξάνονται όλο και



περισσότερο οι μελέτες που σχετίζονται με τους μηχανισμούς χημειοπροφύλαξης. Οι πιθανοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες που ερευνώνται ποικίλλουν ανάλογα με την πηγή, τη χημική δομή και τις επιδράσεις τους και περιλαμβάνουν μικροσυστατικά όπως οι βιταμίνες (φολλικό οξύ και βιταμίνες A, C, E), μεταλλικά στοιχεία (σελήνιο, μολυβδένιο, ασβέστιο), φυσικά προϊόντα (καροτενοειδή, φλαβονοειδή, ισοθειοκυανικά οξέα) και συνθετικά προϊόντα (παράγωγα βιταμίνης A και D) (Greenwald et al., 1995).

Ωστόσο, η απόλυτη ταξινόμηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων δεν είναι εφικτή, διότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης αρκετών ενώσεων δεν είναι ακόμη γνωστός. Επιπρόσθετα, πολλοί παράγοντες φαίνεται ότι δρουν μέσω περισσότερων από έναν μηχανισμών, γεγονός που δυσκολεύει την κατάταξη τους σύμφωνα με τον περισσότερο δραστικό μηχανισμό. Ένα μοντέλο κατηγοριοποίησής τους αναπτύχθηκε από τον Wattenberg και βασίζεται στη χρονική περίοδο κατά την οποία οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες φαίνεται να εμφανίζουν την δράση τους, σε πειραματικά ζωικά μοντέλα καρκινογένεσης (Wattenberg, 1985). Με βάση το μοντέλο αυτό διακρίνονται οι ακόλουθες τρεις κατηγορίες:

**1) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου από πρόδρομες ουσίες (inhibitors of carcinogen formation):** Οι παράγοντες αυτοί συνήθως αναστέλλουν τον σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη, σε όξινο περιβάλλον. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής αποτελεί το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το οποίο όταν βρεθεί σε αρκετή ποσότητα, ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου (Mirvish, 1981) και οδηγεί σε ελάττωση της εμφάνισης όγκων του πνεύμονα σε ποντίκια (Hartman & Shankel, 1990). Επιπλέον, ως αναστολείς σχηματισμού της νιτροζαμίνης δρουν οι φαινόλες (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και γαλλικό οξύ) (Kuenzig et al., 1984) καθώς και σουλφυδρυλικές ενώσεις (Shenoy & Choughuley, 1992). Τα αμινοξέα προλίνη και θειοπρολίνη δεσμεύουν τα νιτρώδη, αντιδρώντας με αυτά ώστε να σχηματίσουν μη μεταλλαξιγόνες νιτροζαμίνες. Η χρησιμότητα των παραγόντων αυτών περιορίζεται όσο αυξάνεται η έκθεση σε «προσχηματισμένα» καρκινογόνα. Ωστόσο, μια πιθανή χρήση των παραγόντων αυτής της κατηγορίας θα μπορούσε να είναι η ενσωμάτωσή τους στη διατροφή ατόμων με αυξημένους ρυθμούς σχηματισμού ενδογενών νιτροζαμινών.

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

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου διακρίνονται σε τρεις επιμέρους ομάδες ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν ενώσεις που αναστέλλουν τη μετατροπή του προ-καρκινογόνου σε καρκινογόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι αποτελεσματικές μόνο έναντι καρκινογόνων που απαιτούν ενεργοποίηση από μια πρόδρομη μορφή. Μια δεύτερη κατηγορία παραγόντων παρεμπόδισης αποτελούν οι ενώσεις που επάγουν την ενίσχυση της ενεργότητας των ενζυμικών συστημάτων που καταλύουν τις αντιδράσεις αποτοξικοποίησης του καρκινογόνου. Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών ουσιών διακρίνεται στις αντιδράσεις φάσης I και στις αντιδράσεις φάσης II. Οι αντιδράσεις φάσης I περιλαμβάνουν αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης και εισάγουν ή έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση μιας λειτουργικής ομάδας, η οποία μπορεί να μετατραπεί με μια αντίδραση σύζευξης (αντιδράσεις φάσης II) σε μια υδατοδιαλυτή ένωση. Οι αντιδράσεις φάσης II περιλαμβάνουν αντιδράσεις σύζευξης με τις οποίες γίνεται προσθήκη γλυκουρονικών ομάδων,θειικών ομάδων, σύνδεση με γλουταθειόνη (GSH), σύνδεση με αμινοξέα, ακετυλίωση ή μεθυλίωση, με σκοπό να αυξηθεί η υδροφιλικότητα των ξενοβιοτικών και να διευκολυνθεί η απέκκρισή τους. Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς προστατεύουν από την τοξικότητα διαφόρων ενώσεων, στις οποίες ανήκουν και τα χημικά καρκινογόνα. Τα ενζυμικά συστήματα που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία, και υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί παράγοντες που ενισχύουν την ενεργότητα των συστημάτων αυτών, στους οποίους ανήκουν αναστολείς ή επαγωγείς του κυτοχρώματος P450 (το οποίο αποτελεί το πιο σημαντικό ενζυμικό σύστημα των αντιδράσεων της φάσης I και γενικότερα του ξενοβιοτικού μεταβολισμού) και επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II (όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η UDP-γλυκουρονυλτρανσφεράση). Ως αναστολείς του κυτοχρώματος P450 δρουν ουσίες όπως τα ισοθειοκυανικά και το ελλαγικό οξύ ενώ ως επαγωγείς δρουν

ουσίες όπως η β- ναφθοφλαβόνη. Ακόμη ουσίες όπως τα ισοθειοκυανικά και οι πολυφαινόλες επάγουν την τρανσφεράση της γλουταθειόνης και τη UDP-γλυκουρονυλτρανσφεράση αντίστοιχα. Τέλος, στην τρίτη ομάδα παρεμπόδισης ανήκουν ουσίες, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν τις ενεργές (ηλεκτρόφιλες) μορφές των καρκινογόνων. Η γλουταθειόνη είναι μια πυρηνόφιλη ένωση που ανήκει σε αυτήν την ομάδα.

**3) Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης (suppressing agents):** Πρόκειται για ενώσεις που αναστέλλουν την προοδευτική φάση της καρκινογενετικής διαδικασίας. Η ταξινόμηση των παραγόντων καταστολής δεν είναι εύκολη, διότι τα πολύπλοκα γεγονότα και η αλληλουχία τους κατά τη διάρκεια της προοδευτικής φάσης της καρκινογένεσης δεν είναι πλήρως κατανοητά. Οι παράγοντες καταστολής μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

➤ Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών

Η συγκέντρωση των πολυαμινών στα κύτταρα σχετίζεται με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και συχνά με τη νεοπλασματική εξαλλαγή (Pegg, 1988). Ένα ένζυμο κλειδί στο βιοσυνθετικό δρόμο των πολυαμινών είναι η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC), που καταλύει τη μετατροπή της ορνιθίνης σε πουτρεσκίνη. Τα επίπεδα της ODC και των πολυαμινών είναι συχνά αυξημένα στους καρκινικούς ιστούς. Επιπλέον οι εστέρες της φορβόλης όπως το TPA (12-tetradecanoylphorbol-13-acetate) προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας της ODC και αύξηση της συγκέντρωσης των πολυαμινών στους προσβεβλημένους ιστούς (Slaga, 1983). Στους παράγοντες που δρουν μέσω αναστολής της ODC συμπεριλαμβάνονται το ελλαγικό οξύ, οι πολυφαινόλες του τσαγιού και η α-difluoromethylornithine (DFMO) (Thompson & Ronan, 1983).

➤ Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης

Η τελική διαφοροποίηση είναι ένα από τα βήματα της φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα να διαφοροποιούνται (Whitfield, 1992). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποκατάσταση της ικανότητας των κυττάρων να διαφοροποιούνται, μπορεί να καταστείλει την καρκινογένεση. Οι πιο γνωστές ενώσεις με αυτή τη δράση είναι η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ. Η ανεπάρκεια βιταμίνης Α προκαλεί πλακώδη μεταπλασία και κερατινοποίηση, που αποτελούν στοιχεία ανώμαλου πολλαπλασιασμού, ενώ η χορήγηση βιταμίνης Α στο πλακώδες κερατινοποιούμενο επιθήλιο πειραματοζώων

αποκαθιστά τη φυσιολογική διαφοροποίηση (Huang et al., 1986). Το ρετινοϊκό οξύ, φαίνεται ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση μέσω σύνδεσης με ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες και πυρηνικούς υποδοχείς (Sani et al, 1990).

➤ Ρυθμιστές της “οδού μετάδοσης του μηνύματος” (signal transduction)  
Τα πολλαπλά μόρια της οδού μετάδοσης του μηνύματος (signal transduction pathway) μπορούν να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης, αποκαθιστώντας τη φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για παράδειγμα, ένα σημαντικό μόριο στη μετάδοση του μηνύματος, είναι η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) από την διακυλογλυκερόλη. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες, όπως τα φλαβονοειδή και το γλυκουρενιτικό οξύ, αναστέλλουν τη δράση της PKC οδηγώντας σε καταστολή της καρκινογένεσης (Kelloff, 1997). Επίσης, η παρατηρούμενη σε πολλά επίπεδα χημειοπροφυλακτική δράση αρκετών παραγόντων, μπορεί να εξηγηθεί μέσω της πολλαπλής δράσης των ουσιών αυτών στα μόρια της οδού μετάδοσης του μηνύματος. Για παράδειγμα, ουσίες όπως τα ρετινοειδή και οι αναστολείς της PKC, που δρουν σε πολλαπλά επίπεδα, όπως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, θα μπορούσαν να επηρεάζουν και άλλα σχετικά γεγονότα, όπως την έκφραση αυξητικών παραγόντων και το μεταβολισμό των πολυαμινών (Kelloff, 1997).

➤ 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. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνει σε επίπεδο υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (όσον αφορά αυξητικούς παράγοντες και πεπτιδικές ορμόνες) ή σε επίπεδο κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποδοχέων (όσον αφορά τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών). Μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι ο αυξητικός παράγοντας TGF-β (transforming growth factor-β) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων (Roberts & Sporn, 1988). Τα αντι-οιστρογόνα, όπως είναι η ταμοξιφαίνη, συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων, αναστέλλοντας τη σύνδεση και δράση των οιστρογόνων (Jordan, 1992). Τα οιστρογόνα εμφανίζουν δράση προαγωγέα σε πολλούς ορμονο-εξαρτώμενους καρκίνους.

➤ 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*, θα πρέπει πρώτα να υποστεί φαρνεσυλίωση. Έχει βρεθεί ότι η ουσία D-λιμονένιο που βρίσκεται στα κίτρα, αναστέλλει τη φαρνεσυλίωση των G-πρωτεϊνών και κατ' επέκταση τη φάση προόδου των όγκων του μαστού, σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά μεταλλαξιγόνα (Elson et al, 1988).

➤ Επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των διόδων κυτταρικής επικοινωνίας (χασμοσύνδεσμοι). Οι χασμοσύνδεσμοι 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 (Lowenstein, 1979). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στην καρκινογενετική διαδικασία. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες, όπως το β-καροτένιο (Zhang, 1991), η κανθαξανθίνη, το ρετινοϊκό οξύ και η βιταμίνη A, προάγουν την επικοινωνία των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων, αναστέλλοντας την καρκινική μεταμόρφωση (Zhang, 1991).

➤ Μόρια-αποκαταστάτες της ανοσολογικής απόκρισης

Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Για παράδειγμα, το ρετινοϊκό οξύ (Hill & Grubbs, 1992) αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killers, NK). Ομοίως, η βιταμίνη E, προκαλεί διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος: φαρμακολογικές δόσεις της βιταμίνης E αυξάνουν την παραγωγή αντισωμάτων κυρίως IgG.

➤ Επαγωγείς της απόπτωσης

Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί σημαντική παράμετρο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ουσίες (p53, TGF-β), εμφανίζουν μεταξύ των άλλων και δράση επαγωγέων της απόπτωσης (Oren, 1992). Η απόπτωση αναστέλλεται από διάφορους προαγωγείς, όπως το TPA και άλλες χημικές ουσίες με μιτογόνο δράση, όπως οι ορμόνες (Bursch, 1992). Από τα στοιχεία αυτά, συμπεραίνουμε ότι η επαγωγή της απόπτωσης μπορεί να αναστείλει την καρκινογένεση. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι

επάγουν την απόπτωση, όπως η ταμοξιφαίνη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (MCF-7) (Bursch, 1992) ή η σουλινδάκη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που αναστέλλει την ανάπτυξη πολυπόδων στο παχύ έντερο (Labayle et al, 1991).

➤ **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 (Wainfain & Poirier, 1992). Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν σαν δότες μεθυλομάδων. Για παράδειγμα, η μεθειονίνη που συμμετέχει μαζί με τις χολίνες, το φολλικό οξύ και τη βιταμίνη B12 στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου μεταβολισμού του μεθυλίου, αναστέλλει τους χημικά προκαλούμενους όγκους του μαστού σε αρουραίους (Wainfain & Dizik, 1987).

➤ **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 οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Έτσι, η χημειοπροφυλακτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών, τουλάχιστον εν μέρει, οφείλεται στην αναστολή της λύσης της βασικής μεμβράνης (Troll & Kennedy, 1988).

➤ **Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος**

Μεταξύ των πολλαπλών γεγονότων 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 οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ το σύστημα της λιποοξυγενάσης μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσατετραενοϊκά οξέα. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας δημιουργούνται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Έχει δειχθεί ότι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ασπιρίνη, ινδομεθακίνη, ιμπουπροφένη, πιροξικάμη) και μερικές αντιοξειδωτικές ουσίες (φλαβονοειδή), είναι δραστικοί αναστολείς της καρκινογένεσης (Reddy et al, 1987). Οι αναστολείς της λιποοξυγενάσης, όπως η βιταμίνη E, που είναι και δότες ηλεκτρονίων (και

αναστέλλουν την δημιουργία ασταθών ελευθέρων ριζών), επίσης αναστέλλουν την προαγωγική φάση της καρκινογένεσης (Huang et al, 1991).

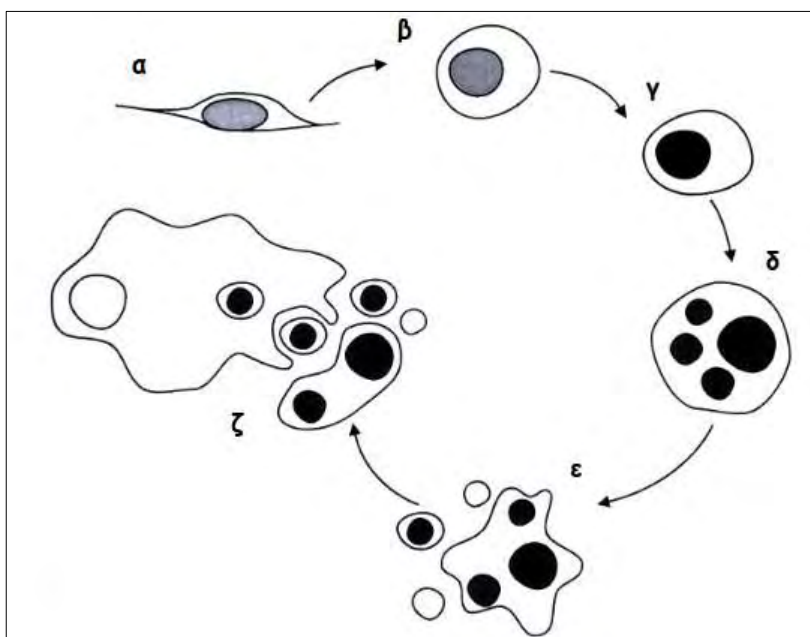
Παρόλο που η σημασία της χημειοπροφύλαξης στον καρκίνο είναι πολύ μεγάλη, ορισμένες μελέτες καταδεικνύουν ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση χημειοπροφυλακτικών προϊόντων, ειδικότερα σε περιπτώσεις ταυτόχρονης χορήγησης φαρμάκων και φυτικών συμπληρωμάτων. Γι' αυτό μελλοντικός στόχος των επιστημόνων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

## **2. Απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος)**

### **2.1. Γενικά**

Η απόπτωση είναι μια φυσική διαδικασία με την οποία το κύτταρο οδηγείται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η διαδικασία της απόπτωσης συνοδεύεται από τις ακόλουθες χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου : συρρίκνωση του κυττάρου, εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη, συμπύκνωση της χρωματίνης, αποδιάταξη του DNA, διάσπαση του κυτταρικού πυρήνα και αποσυναρμολόγησή του μέσα σε αποπτωτικά κυστίδια (Εικόνα 3). Οι παραπάνω μορφολογικές αλλαγές διακρίνουν την απόπτωση από μια άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου γνωστή ως νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος.

Η απόπτωση βασίζεται σε ένα γενετικό πρόγραμμα που είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης και της λειτουργίας του οργανισμού. Σκοπεύει στο να εξαλείψει ανεπιθύμητα ή περιττά κύτταρα με στοχευμένο τρόπο. Οι συνθήκες υπό τις οποίες ενεργοποιείται το αποπτωτικό πρόγραμμα, ποικίλλουν (Krauss, 2002).



**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των μορφολογικών αλλαγών στο κύτταρο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης: Το κύτταρο δέχεται αποπτωτικά σήματα (α), γίνεται κυκλικό (β) και το DNA του συμπυκνώνεται (γ). Το DNA κατακερματίζεται και ο πυρήνας αρχίζει να σπάζει σε διαφορετικά σωματίδια χρωματίνης (δ). Τελικά το κύτταρο διαλύεται σε αρκετά κυστίδια (αποπτωτικά σωματίδια) (ε), τα οποία φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα (ζ)

Η απόπτωση έχει ένα αναπόσπαστο ρόλο στις διαδικασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης, ειδικά στο έμβρυο. Στην προκειμένη περίπτωση εξασφαλίζει έναν τρόπο “διακόπτη” της λειτουργίας των κυττάρων που δεν χρειάζονται πια κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής μορφογένεσης και συναπτογένεσης (Krauss, 2002). Επιπλέον, στο ανοσοποιητικό σύστημα, τα αποπτωτικά προγράμματα ενεργοποιούνται σε διάφορες καταστάσεις, όπως την εξάλειψη στοχευμένων κυττάρων (π.χ. κυττάρων μολυσμένων από ιό) από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και την εξάλειψη των αυτοαντιδρώντων T- ή B- λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα (Krauss, 2002). Τέλος, το αποπτωτικό πρόγραμμα μπορεί να ενεργοποιηθεί από την παρουσία βλάβης στα κύτταρα ή κατά τη διάρκεια στρες. Κύτταρα με DNA που έχει υποστεί βλάβη μπορούν να εξαλειφθούν με τη βοήθεια αποπτωτικών προγραμμάτων πριν να έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύσουν μεταλλάξεις και πιθανόν να εκφυλιστούν σε καρκινικά κύτταρα (Zhivotovsky et al., 2005).



## 2.2. Ομοιόσταση ιστών

Στην απόπτωση αποδίδεται κεντρική σημασία στην ομοιόσταση των ιστών, το γεγονός δηλαδή ότι σε ένα όργανο ή ιστό ο αριθμός των κυττάρων πρέπει να διατηρείται σταθερός μέσα σε στενά όρια. Μια αύξηση στον αριθμό των κυττάρων οφειλόμενη σε κυτταρική διαίρεση αντισταθμίζεται από διαδικασίες για την εξάλειψη των κυττάρων που δεν είναι πλέον λειτουργικά ή είναι γηρασμένα. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία που βοηθά να διατηρηθεί ο αριθμός των κυττάρων μέσα σε έναν ιστό μέσα σε όρια τα οποία είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Μια βλάβη στο αποπτωτικό πρόγραμμα μπορεί να έχει ως συνέπεια μια παθολογική αύξηση ή μείωση των κυττάρων. Παραδείγματα ασθενειών που σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό κυτταρικής επιβίωσης είναι ο καρκίνος και τα αυτοάνοσα νοσήματα, ενώ το AIDS και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα είναι ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένους ρυθμούς απόπτωσης (Krauss, 2002).

## 2.3. Είδη Απόπτωσης

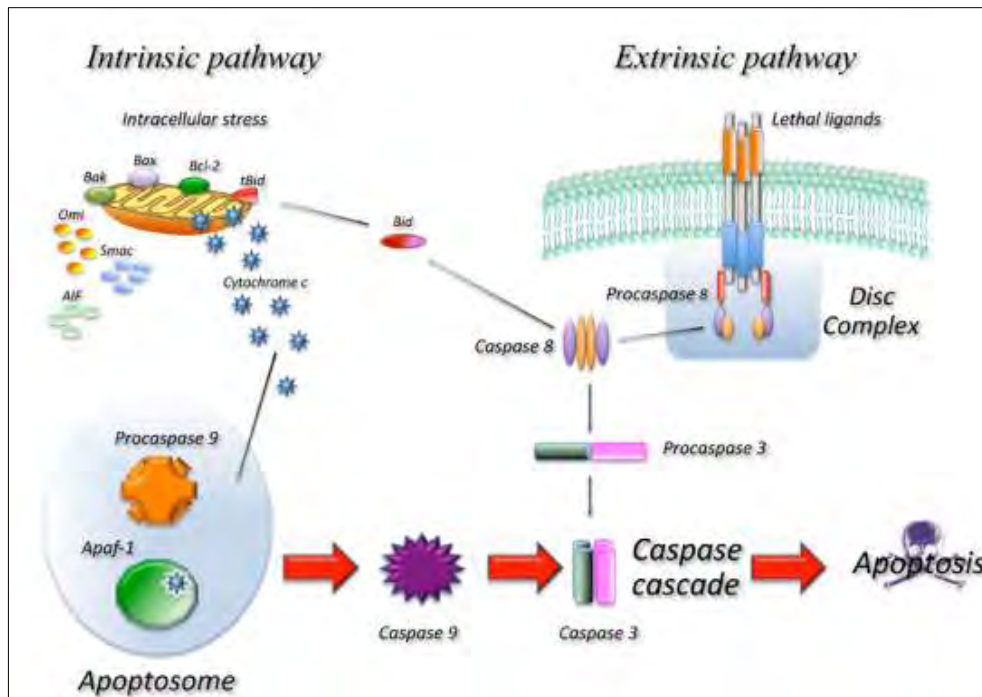
### A) Απόπτωση που κατευθύνεται από εσωτερικά σήματα του κυττάρου

Όλα τα εμπύρνηνα ζωικά κύτταρα περιέχουν την “αιτία” της καταστροφής τους: πρόκειται για τις αδρανείς προκασπάσες που καιροφυλακτούν για ένα σήμα ώστε να καταστρέψουν το κύτταρο. Συνεπώς δεν είναι παράδοξο ότι η δράση των κασπασών ρυθμίζεται προσεκτικά ώστε να διασφαλιστεί ότι το πρόγραμμα θανάτου θα διατηρείται υπό έλεγχο έως ότου χρειαστεί να ενεργοποιηθεί. Οι κύριες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των προκασπασών είναι ενδοκυττάρια και ανήκουν στην οικογένεια της πρωτεΐνης Bcl-2 (Bcl-2 family). Ορισμένα μέλη αυτής της οικογένειας προάγουν την ενεργοποίηση των προκασπασών και τον κυτταρικό θάνατο ενώ άλλες αναστέλλουν αυτές τις διεργασίες. Δύο από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο ονομάζονται Bax και Bak. Αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν έμμεσα τις προκασπάσες, επάγοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταροδιάλυμα. Σε ένα υγιές κύτταρο, η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων εκθέτει την πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου. Εσωτερική καταστροφή του κυττάρου, προκαλείται από τη μετανάστευση των πρωτεϊνών Bax και Bak στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου, όπου αναστέλλουν την προστατευτική δράση της Bcl-2, οδηγώντας στην δημιουργία ενός διαύλου, γνωστού ως MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), μέσω του οποίου το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθώς το

κυτόχρωμα c προσδέεται σε μια πρωτεΐνη-προσαρμοστή (adaptor protein), τον Araf-1, και συγκεκριμένα στην περιοχή WD-40 της πρωτεΐνης αυτής, με αποτέλεσμα την υδρόλυση του συνδεδεμένου dATP σε dADP και σε αλλαγή της διαμόρφωσης του Araf-1. Στην αλλαγμένη του διαμόρφωση, ο Araf-1 δημιουργεί ένα επταμερές σύμπλοκο, το αποπτώσωμα. Η αλλαγή αυτή στη διαμόρφωση του Araf-1 προκαλεί τον ολιγομερισμό και το ξεδίπλωμα των περιοχών CARD, οι οποίες μπορούν πλέον να στρατολογήσουν την προκασπάση 9. Η στρατολόγηση αυτή ενεργοποιεί την προκασπάση 9, η οποία αυτοκαταλυτικά κόβεται και μετατρέπεται σε κασπάση 9 και πλέον παραμένει στενά συνδεδεμένη στην περιοχή CARD του Araf-1. Η σύνδεση της XIAP στην κασπάση 9 αναστέλλει τη δραστηριότητα της. Η XIAP με τη σειρά της μπορεί να απομακρυνθεί από την κασπάση 9 μέσω της SMAC, η οποία επίσης απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο και συνδέεται πολύ ισχυρά στην XIAP. Η ενεργή και πάλι κασπάση 9 στρατολογεί στη συνέχεια κασπάσες-τελεστές, κασπάση 3 και κασπάση 7, ενεργοποιώντας τον καταρράκτη κινασών (εικόνα 4) (Krauss et al., 2002).

#### **B) Απόπτωση που κατευθύνεται από εξωτερικά σήματα (Μονοπάτι Fas)**

Η σύνδεση του προσδέτη Fas (FasL) στον υποδοχέα του Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95) οδηγεί στον τριμερισμό του υποδοχέα και στη δημιουργία του συμπλόκου DISC. Το σύμπλοκο αυτό δημιουργείται από την ένωση του υποδοχέα Fas, της πρωτεΐνης FADD και της κασπάσης 8. Η κασπάση 8 ενεργοποιείται και κόβει την πρωτεΐνη Bid, το καβοξυτελικό άκρο της οποίας (tBid) μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια, όπου ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bax, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Το tBid μπορεί και από μόνο του να προκαλέσει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Από τη στιγμή που θα βρεθεί στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την κασπάση 9 μέσω σύνδεσής της στον Araf 1 παρουσία dATP (εικόνα 4) (Curtin et al., 2003).



**Εικόνα 4: Είδη απόπτωσης:** Απόπτωση που κατευθύνεται από εσωτερικά σήματα του κυττάρου (**intrinsic pathway**) και απόπτωση που κατευθύνεται από εξωτερικά σήματα (**extrinsic pathway**).

### 3. Το φυτό ρόκα (*Eruca sativa*)

Η ρόκα (*Eruca sativa*) είναι ένα μονοετές εδώδιμο φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae* (γνωστή και ως *Cruciferae*=σταυρανθή). Στην ίδια οικογένεια ανήκουν φυτά του γένους *Brassica* (ελαιοκράμβη, μπρόκολο, κουνουπίδι, λάχανο), το πιο γνωστό από τα οποία είναι το φυτό μοντέλο *Arabidopsisthaliana*. Η ρόκα προέρχεται και ευδοκιμεί στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, από το Μαρόκο και την Πορτογαλία στα δυτικά μέχρι την Συρία, τον Λίβανο και την Τουρκία στα ανατολικά. Μπορεί να συλλεχθεί από τη φύση σε άγρια μορφή ή να καλλιεργηθεί ενώ έχει εγκλιματιστεί και στη Βόρεια Αμερική.

Η ρόκα χαρακτηρίζεται από σύντομο βιολογικό κύκλο των 6-9 εβδομάδων. Διαθέτει μικρό γονιδίωμα της τάξης των 560 Mb, που κατανέμεται σε 22 χρωμοσώματα. Το ύψος του φυτού ανέρχεται στα 80-100 εκατοστά με βλαστούς που διακλαδίζονται. Τα άνθη της έχουν διάμετρο 2-4 εκατοστά, είναι λευκά με πορφυρές φλέβες ή κιτρινωπά και είναι διατεταγμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ταξιανθίες, χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας *Brassicaceae*. Τα φύλλα της είναι πτερωτά και αποτελούνται από

4-10 μικρούς πλευρικούς λοβούς και 1 μεγάλο τερματικό λοβό ενώ ο καρπός είναι μικρός και κωνικός, ραμφοειδής και φέρει σπόρια ωοειδούς ,κίτρινου χρώματος. Το μικρό μέγεθος του φυτού, σε συνδυασμό με τη μεγάλη παραγωγή σπόρων, το καθιστά ιδανικό φυτό για εργαστηριακή μεταχείριση.



**Εικόνα 5:** Το φυτό ρόκα (*Eruca sativa*)

Η ρόκα είναι χειμωνιάτικο φυτό ενώ ανθίζει από τον Μάρτιο ως τον Ιούνιο. Ευδοκμεί σε υγρά εδάφη, καταναλώνεται ως τροφή από τις προνύμφες μερικών ειδών σκόρων ενώ οι ρίζες της είναι ευαίσθητες στην μόλυνση από νηματώδεις μύκητες.

Η ρόκα καταναλώνεται ως φυλλώδες λαχανικό και τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος ως συστατικό σε σαλάτες και ως μπαχαρικό, κυρίως σε πληθυσμούς της Μέσης Ανατολής και της Ευρώπης. Από την εποχή του Μεσαίωνα χρησιμοποιείται σε θεραπείες με βότανα λόγω της περιεκτικότητάς της σε ενώσεις που διαθέτουν διουρητική, στυπτική, ενυδατική, αποτοξινωτική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση (Urhof, 1968, Yaniv et al., 1998, Perry & Metzger, 1978), ενώ παράλληλα εμφανίζει ένα πλήθος χημειοπροστατευτικών ιδιοτήτων. Επιπλέον χρησιμοποιείται για τη θεραπεία στομαχικών και νεφρικών διαταραχών, μολύνσεων του ματιού και σκορβούτου και διευκολύνει τη διαδικασία της πέψης (Varga et al., 2009). Η ρόκα αποτελεί πηγή βιταμινών, όπως βιταμίνη C και A, καροτενοειδών και πολυφαινολών, οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως αντιοξειδωτικά. (Heimler et al., 2007, Martinez-Sanchez et al., 2008). Επίσης περιέχει επαρκείς ποσότητες ιχνοστοιχείων κυρίως χαλκού και σιδήρου, ενώ περιέχει σε μικρά

ποσοστά και άλλα βασικά ιχνοστοιχεία και ηλεκτρολύτες όπως το ασβέστιο, το κάλιο, το μαγνήσιο και ο φώσφορος.

Πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί ένας τύπος γλυκοσινολικού οξέος, η γλυκοερουκίνη, που ανιχνεύεται σε υψηλά ποσοστά στη ρόκα. Το προϊόν υδρόλυσης της γλυκοερουκίνης, η ερουκίνη εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (Melchini & Traka, 2010, Alam et al., 2007). Παράλληλα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι το εκχύλισμα αιθανόλης των σπόρων της ρόκας διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και επιδρά προστατευτικά στην ρινική τοξικότητα (Sarwar et al., 2007). Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνδυασμού των παραπάνω ιδιοτήτων της ρόκας αποτελεί η προστατευτική δράση της απέναντι στο έλκος στομάχου (Alqasoumi et al., 2009).

Στο ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων της ρόκας συμπεριλαμβάνονται αντιβακτηριακές (Khoobhandani et al., 2010, Gulfranz et al., 2011) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι μια ομάδα ισοθειοκυανικών οξέων που βρίσκονται στα σπέρματα της ρόκας διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Yehuda et al., 2009).

Έχει προταθεί ότι οι σπόροι της ρόκας ασκούν αντι-διαβητική δράση σε περιπτώσεις χημικά-επαγόμενου σακχαρώδους διαβήτη σε ποντίκια μέσω της μείωσης του οξειδωτικού στρες (Missiry & Gindy, 2000). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι εκχυλίσματα ρόκας εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη προστατευτική δράση ενάντια σε επαγόμενη από  $HgCl_2$  νεφροτοξικότητα σε ποντίκια (Sarwar et al., 2007).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ρόκα διαθέτει χημειοπροστατευτικές ιδιότητες (Michael et al., 2011). Συγκεκριμένα έλαια σπόρων του φυτού μπορούν να καταστείλουν την ανάπτυξη μελανώματος (Khoobhandani et al., 2011). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα ρόκας προκαλούν αναστολή της ογκογένεσης σε ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα (Melchini et al., 2009) και σε ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα (Lamy et al., 2008). Οι χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των φύλλων της ρόκας έχουν διερευνηθεί και σε περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου στον άνθρωπο (Jin et al., 2009). Τέλος, *in vivo* μελέτες σε ποντίκια ανέδειξαν την χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων ρόκας ενάντια στην καταστροφή που προκαλεί στο DNA η χρήση του χημειοπροστατευτικού παράγοντα βινκριστίνη, ο οποίος προκαλεί βλάβες στα κύτταρα του μυελού των οστών (Mahdy et al., 2012).

Βασικό χαρακτηριστικό της οικογένειας *Brassicaceae* είναι η πικρή γεύση τους και η χαρακτηριστική τους οσμή. Οι ενώσεις που ευθύνονται για αυτά τα χαρακτηριστικά είναι γνωστές ως έλαια της μουστάρδας και αποτελούν

προϊόντα αποικοδόμησης συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών, που παράγονται στα φυτά. Οι μεταβολίτες αυτοί ονομάζονται γλυκοσινολικά οξέα και η παρουσία τους στη συγκεκριμένη οικογένεια φυτών αποτελεί ένα σημαντικό γνώρισμα τους (Drewnowski et al., 2000).

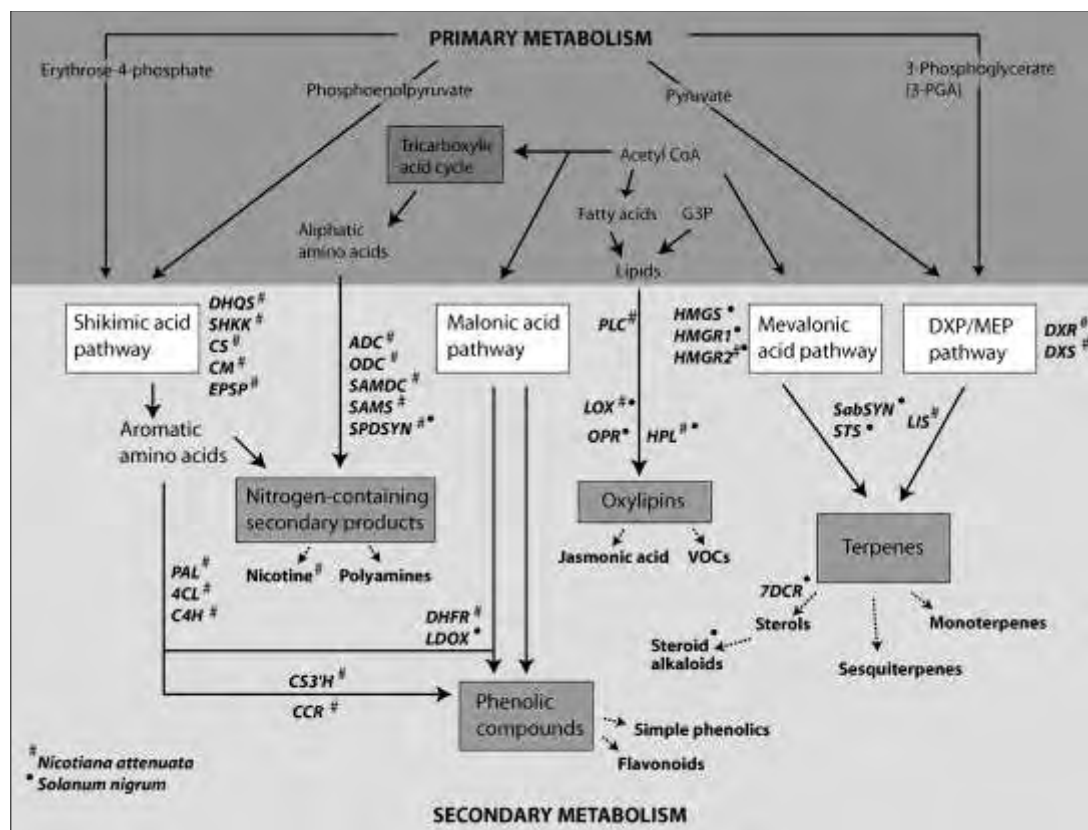
#### **4. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών**

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

Γενικά, ο βιολογικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών έγκειται στην ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας των φυτών στα οικοσυστήματα που ευδοκμούν. Τα φυτά, λόγω της σταθερής και μόνιμης θέσης τους, δεν είναι σε θέση να απομακρυνθούν, ώστε να αποφύγουν τους εχθρούς τους. Παρόλα αυτά προστατεύονται με άλλους τρόπους, αναπτύσσοντας διάφορους μηχανισμούς που τις περισσότερες φορές αναγκάζουν τους εχθρούς τους να τα αποφεύγουν ή και να απομακρύνονται. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν έναν τέτοιο μηχανισμό, καθώς αποτρέπουν ή προκαλούν βλάβες ή ακόμη και σκοτώνουν τους φυτοφάγους οργανισμούς και τα παθογόνα μικρόβια. Επομένως, οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα των φυτών έναντι των ποικίλων εχθρών τους. Οι δευτερογενείς

μεταβολίτες παίζουν σημαντικό ρόλο γενικά στην προσαρμογή των φυτών στις αλλαγές του περιβάλλοντος αλλά και στην αντιμετώπιση στρεσογόνων καταστάσεων, μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος βιοχημικών μηχανισμών και λειτουργιών (Endreva et al., 2008, Hadacek, 2002). Έχουν ανιχνευθεί πάνω από 100.000 δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά και αποτελούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο βιοσύνθεσής τους: τα τερπένια, τις φαινόλες και τις αζωτούχες ενώσεις (εικόνα 6). Τα τερπένια είναι προϊόντα λιπιδικής φύσεως που συντίθενται από το ακετυλο-CoA μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος ή εναλλακτικά μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής 2-μεθυλ-D-ερυθριτόλης από προϊόντα της φωτοσύνθεσης ή της γλυκόλυσης (Plant Physiology, Taiz & Zeiger, 2010). Οι φαινόλες είναι αρωματικές οργανικές ενώσεις, που σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος ή του μονοπατιού του μαλονικού οξέος με διάφορους τρόπους. Τέλος, οι αζωτούχες ενώσεις συντίθενται πρωτογενώς από αμινοξέα. Το άτομο του αζώτου είναι συνήθως μέλος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου και προέρχεται από την -NH<sub>2</sub> ομάδα των αμινοξέων, από τα οποία συντίθενται οι αζωτούχες ενώσεις. Στην κατηγορία των αζωτούχων ενώσεων ανήκουν τα αλκαλοειδή, τα κυανογόνα γλυκοζίδια και τα γλυκοσινολικά οξέα (Plant Physiology, Taiz & Zeiger, 2010).



**Εικόνα 6:** Τα κύρια μονοπάτια βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών, η αλληλεπίδρασή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό και τα εμπλεκόμενα γονίδια στα φυτικά είδη *Nicotiana attenuata* και *Solanum Nigrum*.

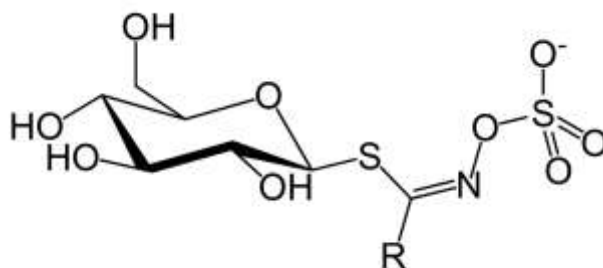
#### 4.1. Γλυκοσινολικά Οξέα

Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με τις ιδιότητες των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων διάσπασής τους έγιναν στο τέλος του 17<sup>ου</sup> αιώνα στην προσπάθεια των ανθρώπων να εξηγήσουν που οφείλεται η έντονη πικρή γεύση των σπόρων του σιναπιού. Η πρώτη γενική, αλλά λανθασμένη δομή των γλυκοσινολικών οξέων προτάθηκε από τον Gadamer (Gadamer, 1897) στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα, σύμφωνα με την οποία η πλευρική αλυσίδα του μορίου συνδέεται στο άτομο αζώτου της θειοκυανιούχου ομάδας αντί στο άτομο του άνθρακα. Η δομή αυτή ήταν αποδεκτή μέχρι που οι Ettliger και Lundeen (Ettliger & Lundeen, 1956) κατέδειξαν τις αδυναμίες της, όσον αφορά στην εξήγηση συγκεκριμένων ιδιοτήτων των μορίων αυτών και πρότειναν τη σημερινή αποδεκτή πλέον δομή, όπου η πλευρική αλυσίδα συνδέεται με τον άνθρακα της θειοκυανιούχου ομάδας. Οι ίδιοι επιστήμονες ήταν οι πρώτοι που συνέθεσαν χημικά γλυκοσινολικά μόρια το 1957. Το τελευταίο ερώτημα σχετικά με τη δομή των μορίων ήταν ο γεωμετρικός ισομερισμός που



αφορούσε το διπλό δεσμό του άνθρακα με το άζωτο που απαντήθηκε με την εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε σινιγρίνη (Marsh & Waser, 1970). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 120 διαφορετικά γλυκοσινολικά οξέα σε διαφορετικά είδη φυτών (Fahey et al., 2001).

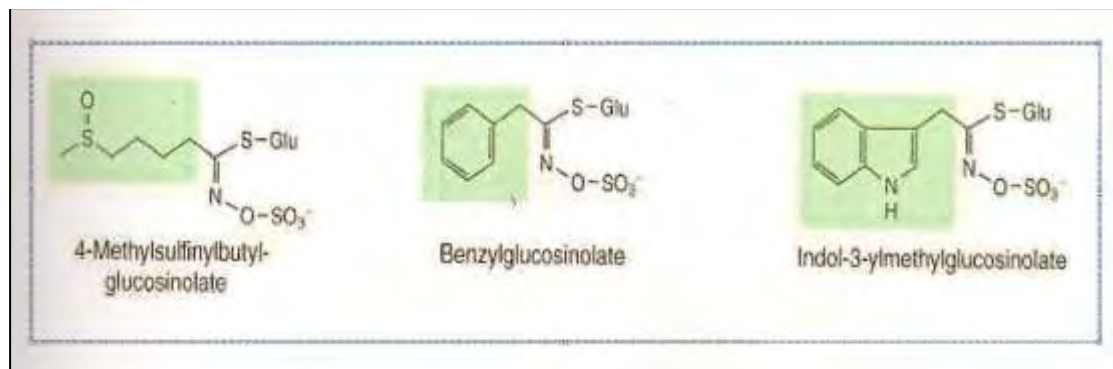
Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι (Z)-(ή cis)-N-υδροξυμινοθειικοί εστέρες που διαθέτουν μια πλευρική αλυσίδα (R), χαρακτηριστική για το κάθε μόριο γλυκοσινολικού οξέος, και ένα τμήμα β-D-γλυκοκυρανόζης που συνδέεται με το μόριο του γλυκοσινολικού οξέος μέσω ενός ατόμου θείου (Εικόνα 7). Είναι παρόντα σε 16 οικογένειες δικοτυλήδων αγγειόσπερμων, που συμπεριλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό εδώδιμων ειδών. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 120 διαφορετικά γλυκοσινολικά οξέα σε φυτά της τάξης *Carpales*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*, τα οποία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε γλυκοσινολικά οξέα και οφείλουν σε αυτά τόσο τη χαρακτηριστική τους γεύση, όσο και τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι συγκριτικά με άλλα καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες, η ρόκα εμφανίζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκοσινολικών οξέων τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες (Fahey et al., 2001, Jin et al., 2009).



**Εικόνα 7:** Δομή γλυκοσινολικών οξέων

Τα γλυκοσινολικά οξέα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τις πλευρικές ομάδες (R) των αμινοξέων από τα οποία συντίθενται. Έτσι, διακρίνονται σε αλειφατικά, αρωματικά και ινδολικά ανάλογα με το αν προέρχονται από αλειφατικά αμινοξέα (μεθειονίνη), αρωματικά αμινοξέα (φαιτυλαλανίνη) ή τρυπτοφάνη αντίστοιχα (Εικόνα 8) (Wittstock & Halkier, 2002). Η ποικιλία στη δομή των γλυκοσινολικών οξέων οφείλεται, εκτός από τα πρόδρομα αμινοξέα, στην ποικιλομορφία του μήκους της πλευρικής αλυσίδας και στα διαφορετικά μοτίβα δευτερογενούς οξειδωσης και εστεροποίησης. Επιπλέον, η συγκέντρωση και η σύνθεση των γλυκοσινολικών

οξέων εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο αλλά και από το σημείο του φυτού από το οποίο προέρχονται (Textor et al., 2004).



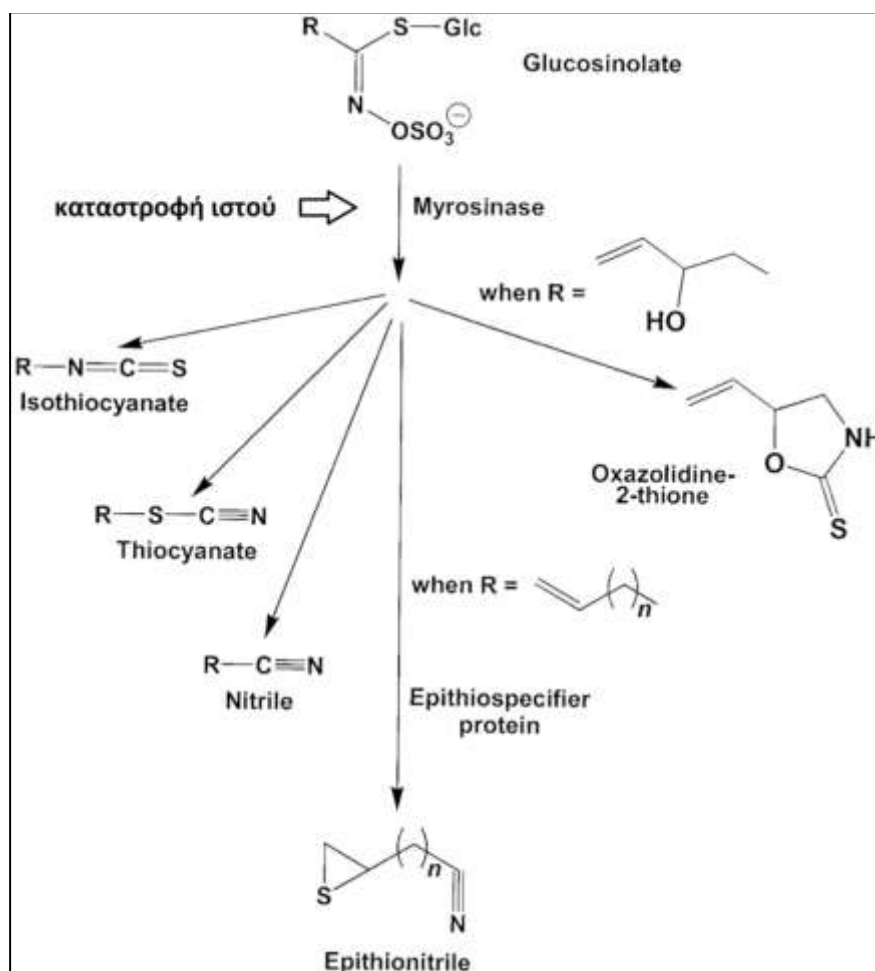
**Εικόνα 8:** Οι 3 κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων

Οι περισσότερες βιολογικές ενεργότητες των γλυκοσινολικών οξέων προκύπτουν από τα προϊόντα υδρόλυσής τους. Η υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων επιτυγχάνεται από το ένζυμο μυροσινάση, μια θειογλυκοϋδρολάση. Το ένζυμο αυτό είναι αποθηκευμένο χωριστά από τα γλυκοσινολικά οξέα, στο χυμοτόπιο ή σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης. Η μυροσινάση έρχεται σε επαφή με τα γλυκοσινολικά οξέα μετά τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και καταλύει την υδρόλυσή τους. Συγκεκριμένα, η μυροσινάση υδρολύει το θειογλυκοσιδικό δεσμό και απελευθερώνεται μια α-γλυκόνη, η οποία μπορεί να αναδιαταχθεί σε ένα ισοθειοκυανικό οξύ είτε να μετατραπεί σε εναλλακτικά προϊόντα, ανάλογα με την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένων δομικών προϋποθέσεων (Εικόνα 9) (Wittstock & Borrow, 2010).



**Εικόνα 9:** Μηχανισμός δράσης του ενζύμου μυροσινάση και παραγωγή ισοθειοκυανικών οξέων

Τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: ισοθειοκυανικά οξέα, οξαζολιδινο-2-θειόνες, θειοκυανικά οξέα, επιθειονιτρίλια και νιτρίλια. Σε ουδέτερο pH, οι ασταθείς α-γλυκόνες, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9 αναδιατάσσονται για να σχηματίσουν ισοθειοκυανικά οξέα (ο σχηματισμός τους επιταχύνεται παρουσία ασκορβικού οξέος). Αν η πλευρική αλυσίδα υδροξυλιωθεί στον άνθρακα 3, η αυθόρμητη κυκλοποίηση του ισοθειοκυανικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας οξαζολιδινο-2-θειόνης. Παρουσία ενός θειοειδικού παράγοντα (εξειδικευμένη πρωτεΐνη) σχηματίζονται νιτρίλια. Αν υπάρχει διπλός δεσμός στο τέλος της πλευρικής αλυσίδας, το άτομο του θείου, που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του νιτρίλιου προσλαμβάνεται από το διπλό δεσμό, σχηματίζοντας θειονιτρίλια. Τέλος, μερικά γλυκοσινολικά οξέα μπορούν να υδρολυθούν προς θειοκυανικά (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων

## 4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων

Τα επίπεδα των γλυκοσινολικών οξέων εξαρτώνται τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες. Η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων εξαρτάται από το είδος και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Charron et al., 2005; Rangkadilok et al., 2002; Rosa et al., 1996). Τα διάφορα είδη σταυρανθών περιέχουν όχι μόνο διαφορετικές συγκεντρώσεις αλλά και διαφορετικούς τύπους γλυκοσινολικών οξέων (Bellostas et al., 2007b; Kushad et al., 1999). Όμως έχουν παρατηρηθεί διαφορές ακόμη και μεταξύ φυτών που ανήκουν στο ίδιο είδος (Charron et al., 2005; Kushad et al., 1999; Rangkadilok et al., 2004; Vallejo et al., 2003). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο γενότυπος επηρεάζει σημαντικά τον τύπο και τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα σταυρανθή. Επιπλέον, το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού ιστού επηρεάζει την περιεκτικότητά του σε γλυκοσινολικά οξέα. Γενικά, οι συγκεντρώσεις των γλυκοσινολικών οξέων είναι μεγαλύτερες στους σπόρους και στη ρίζα, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε νεαρούς φυτικούς ιστούς σε σύγκριση με μεγαλύτερους σε ηλικία (Clossaisbesnard & Larher, 1991; Fahey et al., 1997; Rosa et al., 1996). Ενδεικτικά, φύτρα μπρόκολου περιέχουν 20 φορές μεγαλύτερη ποσότητα γλυκοσινολικών οξέων σε σχέση με τις ανθοκεφαλές. Υπάρχουν αναφορές ότι τα γλυκοσινολικά οξέα συσσωρεύονται στους ιστούς κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης και καταβολίζονται με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωσή τους κατά το αναπαραγωγικό στάδιο (Rangkadilok et al., 2002). Μια μελέτη σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης έδειξε ότι η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου (Vallejo et al., 2003). Αυτή η μεταβολή αποδόθηκε σε σταθερό ρυθμό υδρόλυσης μικρής συγκέντρωσης των γλυκοσινολικών οξέων και στην απελευθέρωση πτητικών ενώσεων, πιθανότατα λόγω νέκρωσης των φυτικών κυττάρων. Εναλλακτικά, η μείωση των γλυκοσινολικών οξέων στους διάφορους ιστούς με την πάροδο του χρόνου μπορεί να οφείλεται σε μεταφορά των μορίων διαμέσου του φλοιώματος (Brudenell et al., 1999). Η θερμοκρασία φαίνεται ότι επηρεάζει τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς, ωστόσο οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία είναι περιορισμένες. Σε μια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η ημερήσια μεταβολή της συγκέντρωσης των γλυκοσινολικών οξέων σε φύτρα λάχανου ήταν μεγαλύτερη όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στους 20° C (Rosa et al, 1996). Σε συνθήκες θερμοκηπίου, η συγκέντρωση των μεμονωμένων γλυκοσινολικών

οξέων μεταβλήθηκε σημαντικά σε ρίζες σιναπιού όταν τα φυτά εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (<math>4^{\circ}\text{C}</math>) για 11 ημέρες, ενώ η συγκέντρωση των ολικών γλυκοσινολικών οξέων παρέμεινε σταθερή (Shattuck et al., 1991). Η περιεκτικότητα γλυκοσινολικών οξέων σε φύτρα μπρόκολου ήταν αυξημένη όταν η θερμοκρασία ανάπτυξής τους ήταν χαμηλότερη ή υψηλότερη από την άριστη για την ανάπτυξη του φυτού (Pereira et al., 2002).

Επιπλέον, η διαθεσιμότητα του νερού άρδευσης επηρεάζει σημαντικά τη χημική σύσταση των λαχανικών. Σε φυτά ελαιοκράμβης η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων αυξήθηκε γραμμικά όταν το υδατικό δυναμικό των φυτών ήταν χαμηλότερο από  $-1.4 \text{ Mpa}$  ( $\text{Mpa}:\text{Megarascal} \rightarrow$  μονάδα μέτρησης του οσμωτικού υδατικού δυναμικού/  $1 \text{ Mpa}=10 \text{ atm}$ ) (Jensen et al., 1996). Σε μια άλλη εργασία διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση της έλλειψης νερού και της αύξησης της συγκέντρωσης των γλυκοσινολικών οξέων σε ξηρό βάρος (Mailer & Cornish, 1987). Παρόλα αυτά δεν έχουν ακόμη διαπιστωθεί τα αίτια που προκαλούν αυτή τη διαφοροποίηση.

Ακόμη, η αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών επηρεάζει την περιεκτικότητα σε γλυκοσινολικά οξέα σε ανθοκεφαλές μπρόκολου (Schonhof et al., 2007b).

Τέλος, η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα σταυρανθή επηρεάζεται σημαντικά από ορισμένα μεταλλικά στοιχεία του εδάφους, που αποτελούν θρεπτικά στοιχεία για το φυτό, όπως το άζωτο και το θείο. Συγκεκριμένα, το θείο εντοπίζεται σε αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, βιταμίνες και συμπράγοντες και σε μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ το άζωτο απαιτείται για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων και πολλών δευτερογενών μεταβολιτών.

Τα γλυκοσινολικά οξέα, όπως γίνεται αντιληπτό και από τη δομή τους (Εικόνα 7) είναι πλούσια σε άζωτο και θείο. Σε ένα μόριο γλυκοσινολικού οξέος υπάρχουν 2 ή 3 άτομα θείου, ένα από το μόριο της κυστεΐνης για τη δημιουργία του θειογλυκοσιδικού δεσμού, ένα από τη θειϊκή ομάδα και ένα από τη μεθειονίνη, σε περίπτωση που το πρόδρομο αμινοξύ είναι η μεθειονίνη. Ο σχηματισμός των γλυκοσινολικών οξέων είναι ο λόγος για τον οποίο τα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae* έχουν υψηλή απαίτηση θείου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η παροχή θείου αυξάνει τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων. Η λίπανση με θείο δεν επηρεάζει μόνο το συνολικό ποσό των γλυκοσινολικών οξέων αλλά και τη συσσώρευση μεμονωμένων γλυκοσινολικών οξέων σε διάφορα είδη της οικογένειας *Brassicaceae*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ισοθειοκυανικά οξέα (ITCS), που θεωρούνται τα πιο σημαντικά, φαρμακολογικά, προϊόντα υδρόλυσης των

γλυκοσινολικών οξέων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση των ITCS επηρεάζεται από την παροχή αζώτου και θείου με τρόπο ανάλογο με αυτό των γλυκοσινολικών οξέων (Gerendas et al., 2008).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών οδήγησαν σε αντικρουόμενα συμπεράσματα όσον αφορά τις επιδράσεις της αζωτούχας λίπανσης και της αλληλεπίδρασής της με την θειϊκή λίπανση, με τη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων και τη σύστασή τους στα φυτά. Σε ορισμένες μελέτες η αύξηση της χορήγησης αζώτου δεν οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των γλυκοσινολικών οξέων στους φυτικούς ιστούς των σταυρανθών, αντιθέτως παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων (Kopsell et al., 2007; Li et al., 2007; Schonhof et al., 2007; Zhao et al., 1993). Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο φαινόμενο της βιοαραιώσης, αφού με τη χορήγηση αυξημένης ποσότητας αζώτου, παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας χωρίς να αυξάνεται αναλογικά η συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στους ιστούς. Από την άλλη πλευρά όμως η αυξημένη παροχή αζώτου στα φυτά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, ενώ μειώνεται η βιοσύνθεση υδατανθράκων όπως η γλυκόζη (Josefsson, 1970). Πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων είναι όπως αναφέρθηκε τα αμινοξέα, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη από τα οποία προκύπτουν οι αντίστοιχες κατηγορίες των αλειφατικών, ινδολικών και αρωματικών γλυκοσινολικών οξέων (Falk et al., 2004; Grubb and Abel, 2006). Η αύξηση της ποσότητας αζώτου που χορηγήθηκε σε φυτά ελαιοκράμβης δεν οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της μεθειονίνης, η οποία παρέμεινε αμετάβλητη (Josefsson, 1970). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και η κυστεΐνη, η οποία συμμετέχει στη διαδικασία βιοσύνθεσης των γλυκοσινολικών οξέων. Ως εκ τούτου, η επίδραση του αζώτου στη βιοσύνθεση των γλυκοσινολικών οξέων φαίνεται ότι συνδέεται με την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδρά και με τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά.

Η αύξηση της χορήγησης θείου σε διάφορα είδη σταυρανθών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε γλυκοσινολικά οξέα (Chen et al., 2006; Kopsell et al., 2007; Li et al., 2007; Rangkadilok et al., 2004; Schonhof et al., 2007). Το θείο φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με την χορήγηση αζώτου στα φυτά και η μέγιστη περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε γλυκοσινολικά οξέα φαίνεται ότι επιτυγχάνεται όταν τα δύο αυτά στοιχεία βρίσκονται σε επαρκείς ποσότητες και σε μια ισορροπία, η οποία είναι ανάλογη του είδους του φυτού αλλά και διάφορων περιβαλλοντικών

παραγόντων. Έτσι για κάθε είδος φυτού υπάρχει μια βέλτιστη αναλογία N:S (Li et al., 2007, Omirou et al., 2009). Επομένως, με κατάλληλη λίπανση θείου και αζώτου μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωση γλυκοσινολικών στα φυτά της οικογένειας *Brassicaceae*.

#### **4.3. Βιολογικές δράσεις των γλυκοσινολικών οξέων στα φυτά και στον άνθρωπο**

Είναι γνωστό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, στους οποίους ανήκουν τα γλυκοσινολικά οξέα, συμμετέχουν στην προστασία των φυτικών ιστών και επηρεάζουν μια σειρά σημαντικών λειτουργιών, όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Ειδικότερα παρεμβαίνουν ως εξειδικευμένα σήματα για τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών και προστατεύουν τους ιστούς από αβιοτικές καταπονήσεις, μέσω του συστήματος γλυκοσινολικών-μυροσινάσης. Ορισμένα προϊόντα αποικοδόμησης των γλυκοσινολικών οξέων εμπλέκονται στη θρέψη των φυτών και στη ρύθμιση της ανάπτυξής τους (Hadacek, 2002, Grubb & Abel, 2006), ενώ άλλα εμφανίζουν τοξικότητα σε παθογόνους και μη μικροοργανισμούς του εδάφους όπως νηματώδεις, μύκητες και βακτήρια. Εξαιτίας της παραγωγής των τοξικών ισοθειοκυανικών οξέων κατά την υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων, τα γλυκοσινολικά οξέα είναι σημαντικά μόρια των φυτών, που καθορίζουν τη σχέση τους με διάφορα έντομα. Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης τους δρουν ως εντομοαπωθητικά (Noret et al., 2005; Siemens & Mitchell-Olds, 1996), ενώ μειώνουν σημαντικά την επιβίωση και ανάπτυξη εντόμων που προσβάλλουν τα σταυρανθή (Agrawal & Kurashige, 2003; Burrow et al., 2006). Αντιθέτως έχει δειχθεί ότι τα ίδια μόρια μπορούν να δράσουν και ως προσελκυστικά για εχθρούς που προσβάλλουν αποκλειστικά τα σταυρανθή (Mewis et al., 2002; Miles et al., 2005; Rojas, 1999). Εκτός από τα παραπάνω έχει προταθεί ότι τα γλυκοσινολικά οξέα χρησιμοποιούνται από τα φυτά για την αποθήκευση θείου, κυρίως κατά το στάδιο της σποροποίησης των φυτών αφού σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αντιπροσωπεύουν το 30% του ολικού θείου που περιέχεται στα σπέρματα (Falk et al., 2007). Έτσι κατά τη βλάστηση των σπερμάτων μπορεί να υποθέσει κανείς, ότι τα φυτά χρησιμοποιούν τα γλυκοσινολικά οξέα ως πηγή θείου για την ικανοποίηση των αναγκών τους. Επιπλέον, τα γλυκοσινολικά οξέα είναι υπεύθυνα για τη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα των σταυρανθών λαχανικών και μπαχαρικών, τα οποία οφείλονται στα έλαια μουστάρδας που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των γλυκοσινολικών οξέων.

Εκτός από τη σημαντική βιολογική τους δράση στην άμυνα των φυτών, τα γλυκοσινολικά οξέα παρουσιάζουν ωφέλιμες επιδράσεις και στην υγεία του ανθρώπου. Πιστεύεται ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων και συγκεκριμένα τα ισοθειοκυανικά οξέα, ευθύνονται για τις προστατευτικές επιδράσεις των σταυρανθών λαχανικών στην υγεία του ανθρώπου (Mithen, 2000, 2001; Juge et al., 2007).

Τα ισοθειοκυανικά οξέα διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα NF-κΒ και στην αναστολή του TNF-α και της μεσολαβούμενης από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) φλεγμονώδους απόκρισης (Heiss et al., 2001). Επιπλέον, τα ισοθειοκυανικά οξέα διαθέτουν αντιβακτηριακή δράση έναντι του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί γαστρίτιδα, πεπτικό έλκος και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου (Fahey et al., 2002). Πειράματα σε ζώα-μοντέλα με έμφραγμα του μυοκαρδίου ανέδειξαν τις προστατευτικές επιδράσεις των ισοθειοκυανικών οξέων, και συγκεκριμένα εκείνων που περιέχονται στο μπρόκολο (sulphoraphane, allylisothiocyanate), ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Cornelis et al., 2007).

#### **4.4. Αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων**

Εκτεταμένες έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολικών οξέων, τα ισοθειοκυανικά οξέα, εμφανίζουν αντικαρκινική δράση. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν αναλύονται στη συνέχεια.

##### i) Αναστολή της δράσης των ενζύμων που συμμετέχουν στις αντιδράσεις φάσης I

Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις φάσης I εμπλέκονται στη βιομετατροπή ορισμένων προ-καρκινογόνων σε ενεργές μορφές καρκινογόνων, οι οποίες στη συνέχεια δεσμεύονται στο DNA και προκαλούν μεταλλάξεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 (CYP450). Η αναστολή των ενζύμων της οικογένειας CYP450, που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση προ-καρκινογόνων, έχει δείχθει ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου σε ζωικά μοντέλα (Hecht, 2004). Τα ισοθειοκυανικά οξέα (phenethyl isothiocyanate και benzylisothiocyanate) έχει βρεθεί ότι δρουν ως παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου μέσω αναστολής των ενζύμων της οικογένειας CYP450 (Conaway et al., 2002; Hecht, 2000). Επιπλέον μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες

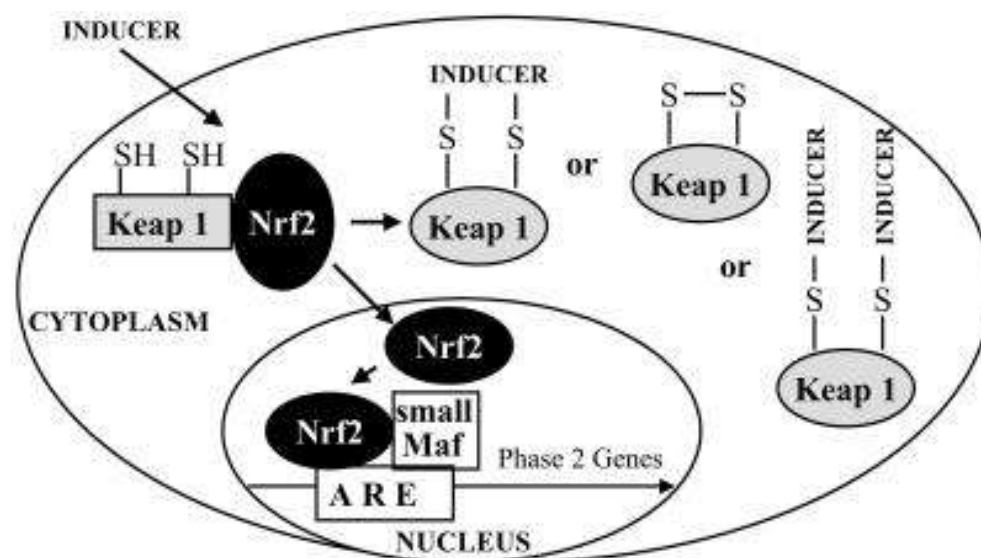


έδειξαν ότι το ισοθειοκυανικό οξύ σουλφοραφάνη αναστέλλει ορισμένα ένζυμα της οικογένειας CYP450 (Fimognari et al., 2007). Τέλος, σε μια κλινική δοκιμή στην οποία καπνιστές κατανάλωσαν 170 g καρδάμου (πλούσιο σε phenethyl isothiocyanate) ανά ημέρα για 3 συνολικά ημέρες, παρατηρήθηκε η παρεμπόδιση της δράσης του καρκινογόνου που περιέχεται στον καπνό (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) (Hecht et al., 1995).

#### ii) Επαγωγή της δράσης των ενζύμων που συμμετέχουν στις αντιδράσεις φάσης II

Πολλά μέλη των ισοθειοκυανικών οξέων και ιδιαίτερα η σουλφοραφάνη επάγουν τη δράση των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις φάσης II σε καλλιέργειες ανθρωπίνων κυττάρων (Zhang, 2004, Fimognari et al., 2007). Τα ένζυμα φάσης II παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από την καταστροφή του DNA από τις καρκινογόνες ενώσεις και από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Kensler et al., 2004). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα, που καταλύουν τις αντιδράσεις φάσης II διαθέτουν μια εξειδικευμένη αλληλουχία DNA, που καλείται antioxidant response element (ARE). Έχει δειχθεί ότι τα ισοθειοκυανικά οξέα επάγουν τη δράση των ενζύμων, που καταλύουν τις αντιδράσεις φάσης II, μέσω της επιτάχυνσης της μεταγραφής των γονιδίων που περιέχουν την αλληλουχία ARE. Αναλυτικά, συγκεκριμένα μόρια-επαγωγείς όπως τα ισοθειοκυανικά οξέα, διαταράσσουν το κυτταροπλασματικό σύμπλοκο μεταξύ των πρωτεϊνών Nrf2 (αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα) και της Keap 1 (πρόκειται για μια πρωτεΐνη προσκολλημένη στον κυτταροσκελετό της ακτίνης) με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 να μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου και να δημιουργεί ετεροδιμερή σύμπλοκα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον μεταγραφικό παράγοντα Maf. Τα ετεροδιμερή σύμπλοκα προσδένονται στην αλληλουχία ARE των γονιδίων, που κωδικοποιούν για τα ένζυμα των αντιδράσεων φάσης II και επιταχύνουν τη μεταγραφή τους (Εικόνα 11) (Dinkova-Kostova, 2002). Κλινικές δοκιμές που διεξήχθησαν σε καπνιστές οι οποίοι κατανάλωναν 170 g καρδάμου (πλούσιο σε phenethyl isothiocyanate) ανά ημέρα για 3 συνολικά ημέρες, έδειξαν αυξημένη έκκριση γλυκουρονιωμένων μεταβολιτών νικοτίνης, γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη δράση του ενζύμου UDP-γλυκουρονυλτρανσφεράση (ένζυμο αντιδράσεων φάσης II) (Hecht et al., 1999). Τέλος, κλινικές δοκιμές σε μη καπνίζοντες έδειξαν ότι η κατανάλωση 300 g από λαχανάκια Βρυξελλών ανά ημέρα για 1 εβδομάδα αύξησε

σημαντικά τα επίπεδα της μεταφοράς της γλουταθειόνης (ένζυμο αντιδράσεων φάσης II) στο πλάσμα και στο έντερο (Nijhoff et al., 1995).



**Εικόνα 11:** Μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ένζυμα των αντιδράσεων φάσης II. Στην εικόνα φαίνονται μερικές τροποποιήσεις της Keap1 πρωτεΐνης από τα μόρια-επαγωγείς.

iii) Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης  
 Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται γρήγορα και χάνουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε σήματα κυτταρικού θανάτου που επάγουν την απόπτωση. Τα ισοθειοκυανικά οξέα επάγουν την απόπτωση μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και μέσω της ρύθμισης της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 και του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK κινασών, που έχουν ως συνέπεια την ενεργοποίηση των κασπασών. Αντίστοιχα, η καταστολή του κυτταρικού κύκλου γίνεται στοχεύοντας τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Clarke et al., 2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα του συγκεκριμένου μηχανισμού δράσης των ισοθειοκυανικών οξέων αποτελούν εκείνα που αναστέλλουν την ενεργότητα του πρωτεασώματος και επάγουν την καταστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό κυττάρων πολλαπλού μυελώματος (Mi et al., 2010).

#### iv) Αναστολή της αποακετυλίωσης των ιστονών

Στον πυρήνα το DNA τυλίγεται γύρω από ένα οκταμερές πρωτεϊνών, που ονομάζονται ιστόνες. Η ακετυλίωση των ιστονών από τις ακετυλο-τρανσφεράσες (HATs) καθιστά το DNA πιο προσιτό σε μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι προσδένονται σε αυτό και ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων. Αντίθετα, η αποακετυλίωση των ιστονών από τις αποακετυλάσες (HDACs) περιορίζει την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Η ακετυλίωση και η αποακετυλίωση των πυρηνικών ιστονών είναι ένας σημαντικός κυτταρικός μηχανισμός που ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων (Mei et al., 2004). Ωστόσο η ισορροπία μεταξύ της δράσης των HATs και των HDACs που παρατηρείται στα φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να διαταραχθεί στα καρκινικά κύτταρα. Ενώσεις που αναστέλλουν τη δράση των αποακετυλασών των ιστονών μπορούν να καταστείλλουν την ανάπτυξη καρκίνου μέσω της επαγωγής της μεταγραφής ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών που προωθούν τη διαφοροποίηση και την απόπτωση προ-καρκινικών κυττάρων (Marks et al., 2004). Μεταβολίτες των ισοθειοκυανικών οξέων, όπως η σουλφοραφάνη και το αλυλ-ισοθειοκυανικό (allylisothiocyanate), έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την δράση των HDACs σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές επιθηλίου προστάτη, παγκρέατος και μαστού (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 και T47D) (Myzak et al., 2004, Lea et al., 2002, Myzak et al., 2006, Pledgie et al., 2007).

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία μελέτησε την επίδραση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το φυτό ρόκα (*Eruca sativa*) στην ανάπτυξη ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa), ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG<sub>2</sub>) και ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7 και MDA-MB-231). Συγκεκριμένα, φυτά ρόκας αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες λίπανσης θείου και αζώτου και απομονώθηκαν εκχυλίσματα από διαφορετικά τμήματα του φυτού (φύλλα και ρίζες). Καθώς τα εκχυλίσματα διαφέρουν όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε γλυκοσινολικά οξέα μελετήθηκε η κυτταροτοξική τους δράση έναντι των διαφορετικών καρκινικών κυττάρων καθώς και ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκούν την δράση τους.

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X):** θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 41966-052). Περιέχει 4500 mg/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ.
- **FBS (Fetal Bovine Serum):** βόειος εμβρυϊκός ορός (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 10270-106). Παρέχει στα κύτταρα τους αυξητικούς παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Πριν από τη χρήση ο ορός απενεργοποιείται με θέρμανση στους 55°C για 30 λεπτά (heat inactivation), ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και αποθηκεύεται στους -20°C. Η τελική συγκέντρωση του ορού στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας είναι 10% v/v.
- **Αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη/πενικιλίνη:** Παρέχονται από την εταιρεία Gibco, σε διάλυμα 100X (αριθμός καταλόγου 15140-122). Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστατεύουν τις κυτταροκαλλιέργειες από την ανάπτυξη μικροβιακών παραγόντων. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι 100 units/mL πενικιλίνης και 100 µg/mL στρεπτομυκίνης.
- **Διάλυμα τρυψίνης 0,5% v/v (10X) σε EDTA** (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 15400-054): Περιέχει 5 g/L τρυψίνη (1:250), 2 g/L EDTA 4Na, 8.5 g/L NaCl (10X). Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1X σε διάλυμα PBS. Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας.
- **PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X):** ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (εταιρεία Gibco, αριθμός καταλόγου 20012-019). Περιέχει 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2. Χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των κυττάρων πριν από την επεξεργασία τους με τρυψίνη, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολλειμάτων του ορού από τη φλάσκα καλλιέργειας τα οποία δρουν ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου θρυψίνη.
- **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)** (εταιρεία Sigma, αριθμός καταλόγου D2650): Το DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) δρα ως κρυσταλλοπροστατευτικός παράγοντας κατά το πάγωμα των κυττάρων. Συγκεκριμένα αλλάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και εμποδίζει τον σχηματισμό πολλών κρυστάλλων

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

➤ **Αναστολέας των κασπασών, caspase Inhibitor (Ac-DEVD-CHO):** (εταιρεία Promega, αριθμός καταλόγου G5968). Χρησιμοποιείται για την αναστολή της κασπάσης 3. Ο αναστολέας κασπάσης 3 παρέχεται σε συγκέντρωση 10 mM σε διάλυμα DMSO και αποθηκεύεται στους -20°C για την προστασία του από την υγρασία, κατά προτίμηση σε αποξηρανή.

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

## 2. Φυτικό Υλικό

### 2.1. Καλλιέργεια

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φύλλα και ρίζες του φυτού *Eruca sativa* (ρόκα).

#### 2.1.1. Καλλιεργητικές φροντίδες

Για την εκτέλεση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα ρόκας (*Eruca sativa*) σε γλάστρες των 12L. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα αδρανούς άμμου (ποταμίσια) στην οποία είχε πραγματοποιηθεί χημική ανάλυση ως προς την περιεκτικότητα της σε θείο και άζωτο και η οποία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση σε πειράματα θρέψης. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε ψυχρό θερμοκήπιο, συνολικής έκτασης 700m<sup>2</sup> στον Πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι, Κύπρος.

#### 2.1.2. Πειραματικό Σχέδιο

Σε πλήρως τυχαίοποιημένο σχέδιο εξετάστηκαν οι δυο παράγοντες (N και S) σε 2 δόσεις και σχεδιάστηκαν 4 μεταχειρίσεις των 4 επαναλήψεων. Κάθε μεταχείριση αποτελούνταν από 10 γλάστρες σε κάθε μια από την οποία υπήρχαν δέκα φυτά ρόκας. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 50 και 250 kg/ha για το άζωτο και 10 και 150 kg/ha για το θείο. Ο υπολογισμός των λιπασμάτων που χορηγήθηκε υπολογίστηκε σύμφωνα με την επιφάνεια της

γλάστρας αφού το ύψος των γλαστρών ήταν μεγαλύτερο από τα 25cm. Τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία χορηγήθηκαν στα φυτά σύμφωνα με του κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής, που ακολουθούνται κατά την καλλιέργεια των ειδών αυτών. Το N χορηγήθηκε με τη μορφή  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  και το θείο με την μορφή  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Η εξισορρόπηση της ποσότητας του K πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση ανάλογης ποσότητας, KCl.

### 2.1.3. Δειγματοληψία – Επεξεργασία Δείγματος

Στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου και στην περίοδο της φυσιολογικής ωρίμανσης των βρώσιμων τμημάτων πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των φυτικών ιστών που εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε N, S και γλυκοσινολικά οξέα. Συγκεκριμένα από κάθε μεταχείριση, συλλέγονταν ολόκληρα τα φυτά και τυχαία απομακρύνονταν 15 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (ίδιου μεγέθους), χωρίς προσβολές και μηχανικούς τραυματισμούς. Τα φύλλα τοποθετούνταν αμέσως σε δοχεία πολυστερίνης με ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

### 2.2. Απομόνωση εκχυλισμάτων γλυκοσινολικών οξέων

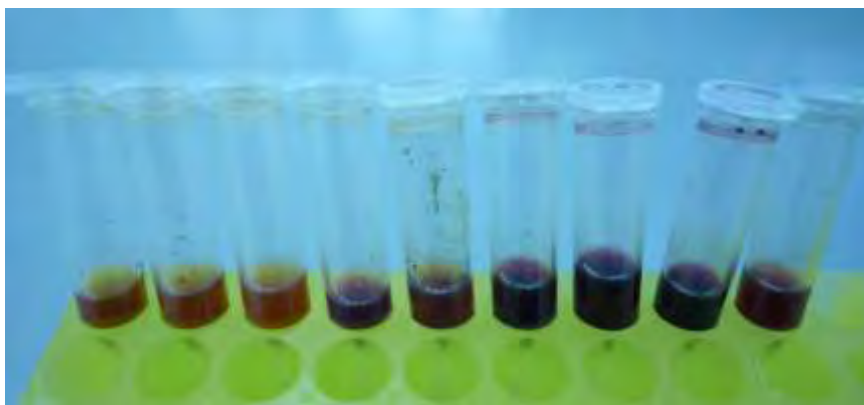
Οι αποθηκευμένοι ιστοί θρυμματίστηκαν με χρήση υγρού αζώτου και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, χωριστά για κάθε μεταχείριση. Στη συνέχεια έγινε αποξήρανση των δειγμάτων με φυγοκεντρικό συμπυκνωτή Speedvac (χρόνος 24 h, πίεση 5,1 Torr, θερμοκρασία 45°C).



**Εικόνα 12 :** Ιστός φύλλων πριν και μετά την αποξήρανση

Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ζεστή μεθανόλη 70%, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο μυροσινάση που υδρολύει τα γλυκοσινολικά οξέα, σε αναλογία 1:10 (σε 1 g δείγματος προστίθενται 10 mL μεθανόλης). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος. Η ανωτέρω διαδικασία (προσθήκη ζεστής μεθανόλης 70% και λήψη του υπερκείμενου διαλύματος) πραγματοποιήθηκε ακόμη δυο φορές και στο τέλος τα υπερκείμενα ενώθηκαν. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για την απομάκρυνση των ιζημάτων και την λήψη των υπερκειμένων (χρόνος 15 min, 2000g). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φυγοκεντρικό συμπυκνωτή Speedvac (πίεση 5,1 Torr, θερμοκρασία 45°C) ώσπου ο όγκος τους να μειωθεί στο 20-30% του αρχικού.

Τα δείγματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, οι οποίες πρέπει να κατακρημνιστούν. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού ψευδαργύρου 1M (προσθήκη 10 μl για κάθε 0,5 ml δείγματος) και τα δείγματα αφέθηκαν για ηρεμία στους 4°C για 2-3 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για κατακρήμιση πρωτεϊνών (10.000 στροφές/min για 10 min) και συλλογή του υπερκειμένου. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον φυγοκεντρικό συμπυκνωτή Speedvac μέχρις ότου εξατμιστεί ολόκληρη η ποσότητα της μεθανόλης που περιείχαν. Η επαναδιάλυση των ιζημάτων έγινε σε αποστειρωμένο, διπλά απιονισμένο νερό σε τελική συγκέντρωση ίση με 200 mg/mL.



**Εικόνα 13 :** Συμπυκνωμένα εκχυλίσματα



Στον πίνακα 1 φαίνεται η αρχική ποσότητα κάθε δείγματος κάθε μεταχείρισης, η ποσότητά του μετά την αποξήρανση και ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος (όγκος νερού που προστέθηκε σε κάθε δείγμα).

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

Μεταχείριση	Ποσότητα δείγματος πριν την αποξήρανση (mg)	Ποσότητα δείγματος μετά την αποξήρανση (mg)	Τελικός όγκος του κάθε δείγματος (mL) (όγκος H <sub>2</sub> O που προστέθηκε σε κάθε δείγμα)
N <sup>+</sup> /S <sup>+</sup> Φύλλα	903,95	396,6	0,3305
N <sup>+</sup> /S <sup>+</sup> Ρίζες	1504,0	153,0	0,765
N <sup>+</sup> /S <sup>-</sup> Φύλλα	491,0	43,6	0,436
N <sup>+</sup> /S <sup>-</sup> Ρίζες	623,6	69,8	0,349
N <sup>-</sup> /S <sup>+</sup> Φύλλα	1088,2	101,3	0,5065
N <sup>-</sup> /S <sup>+</sup> Ρίζες	1014,5	111,2	0,556
N <sup>-</sup> /S <sup>-</sup> Φύλλα	835,4	172,0	0,86
N <sup>-</sup> /S <sup>-</sup> Ρίζες	953,2	122,7	0,6135

### **3. Καρκινικές κυτταρικές σειρές**

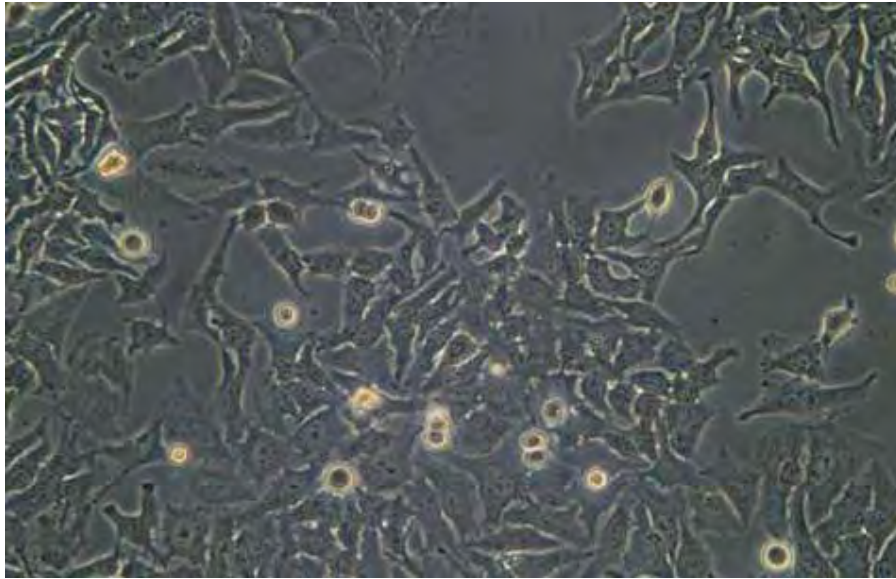
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω καρκινικές κυτταρικές σειρές: HeLa, HepG<sub>2</sub>, MCF-7 και MDA-MB-231.

#### **3.1. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa)**

Τα κύτταρα HeLa (Εικόνα 14) προέρχονται από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και αποτελούν την πιο παλιά και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά. Απομονώθηκαν από ένα επιθετικό αδenoκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας μιας γυναίκας ασθενούς (Henrietta Lacks) περίπου 60 χρόνια πριν και έκτοτε αποτελούν ένα πολύ βασικό εργαλείο στην έρευνα για τον καρκίνο. Στο όνομα αυτής της γυναίκας οφείλεται και η ονομασία τους.

Τα κύτταρα HeLa πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα, συγκρινόμενα ακόμη και με άλλα καρκινικά κύτταρα. Όπως και άλλα καρκινικά κύτταρα, τα κύτταρα HeLa διαθέτουν μια ενεργή μορφή της τελομεράσης κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων (Ivanconic et al., 2007), αποτρέποντας την σταδιακή βράχυνση των άκρων των τελομερών, γεγονός το οποίο εμπλέκεται στη γήρανση και στον κυτταρικό θάνατο. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα HeLa παρακάμπτουν το όριο Hayflick, που είναι ο περιορισμένος αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων που πραγματοποιούν τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα προτού πεθάνουν, σε μια κυτταροκαλλιέργεια.

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων από τον ανθρώπινο ιό papilloma 18 (HPV18) στα ανθρώπινα κύτταρα του τραχήλου της μήτρας «δημιούργησε» το γονιδίωμα των κυττάρων HeLa, το οποίο είναι διαφορετικό από το γονιδίωμα των κυττάρων HeLa, που είχαν απομονωθεί από την Henrietta Lacks σε ποικίλα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Τα κύτταρα HeLa είναι ταχέως διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους ποικίλλει κατά τη διάρκεια σχηματισμού του καρκινικού όγκου. Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις τα κύτταρα HeLa είναι τριπλοειδή κύτταρα (αποκλείοντας πολύ μικροσκοπικά χρωμοσωμικά τμήματα), γεγονός που σημαίνει ότι αποτελούνται συνολικά από 76-80 χρωμοσώματα. Μεταξύ αυτών περιέχονται 22-25 χρωμοσώματα που είναι μη φυσιολογικά πολλαπλασιασμένα και είναι γνωστά ως HeLa signature chromosomes (Macville et al., 1999, Landry et al., 2013, Bottomley et al., 1969, Adey et al., 2013).



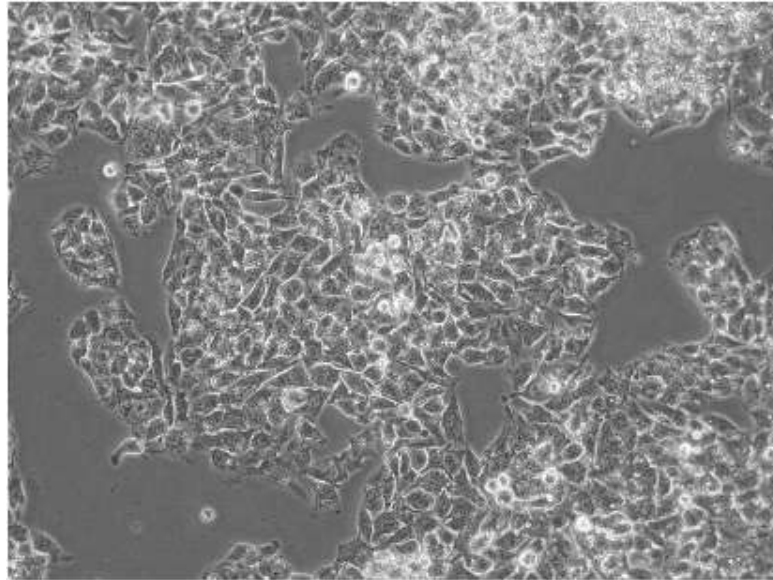
**Εικόνα 14:** Κύτταρα HeLa από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης

### **3.2. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG<sub>2</sub>)**

Τα κύτταρα HepG<sub>2</sub> (Εικόνα 15 ) είναι ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος. Πρόκειται για μια ανέτως διαιρούμενη κυτταρική σειρά που απομονώθηκε για πρώτη φορά από έναν δεκαπεντάχρονο Αμερικανοκαυκάσιο άνδρα, που έπασχε από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα HepG<sub>2</sub> έχουν μορφολογία που ομοιάζει με τα επιθηλιακά κύτταρα, διαθέτουν 55 χρωμοσώματα και δεν είναι ορατά υπό τη μορφή όγκων σε ποντίκια χωρίς τρίχωμα. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνών πλάσματος (αλβουμίνη, τρανσφερίνη) και πρωτεϊνών οξείας φάσης, των οποίων οι συγκεντρώσεις αυξάνονται ή μειώνονται στο πλάσμα του αίματος ως απόκριση σε περιπτώσεις φλεγμονής (ινωδογόνο, α<sub>2</sub>-μικροσφαιρίνη, α<sub>1</sub>-αντιτρυψίνη, τρανσφερίνη, πλασμινογόνο). Τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονται επιτυχώς σε μεγάλης-κλίμακας συστήματα καλλιέργειας (Van IJzendoorn et al., 1997).

Παρουσία κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν διακριτή μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση με ελεγχόμενο σχηματισμό των κορυφαίων και πλευροβασικών κυτταρικών επιφανειών (Van IJzendoorn et al., 1997). Λόγω του υψηλού βαθμού μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης τους *in vitro*, αποτελούν ένα κατάλληλο μοντέλο για την μελέτη του ηπατικού μεταβολισμού, την μελέτη μεταβολισμού ξενοβιοτικών ουσιών καθώς και την ανίχνευση

περιβαλλοντικών και διατροφικών κυτταροτοξικών και γενετοξικών αναλόγων (Mersch-Sundermann et al, 2004).



**Εικόνα 15:** Κύτταρα HepG<sub>2</sub> από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων

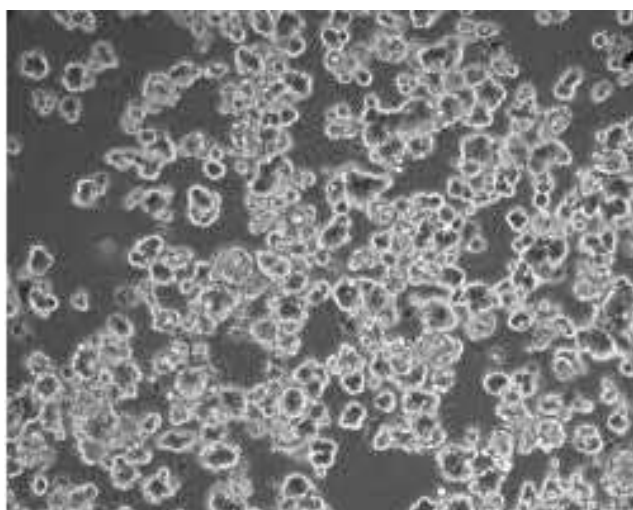
### **3.3. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (ορμονοεξαρτώμενα) (MCF-7)**

Τα κύτταρα MCF-7 είναι ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού που απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1970 από μια Καυκάσια γυναίκα 69 ετών. Το όνομά τους είναι ακρωνύμιο του ινστιτούτου Michigan Cancer Foundation-7, όπου η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά καθιερώθηκε το 1973 από τον Herbert Soule και τους συνεργάτες του (Soule et al., 1973). Πριν από την ανακάλυψη της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς δεν ήταν δυνατόν για τους ερευνητές να αποκτήσουν μια κυτταρική σειρά θηλαστικών, που θα είχε τη δυνατότητα να επιβιώσει για περισσότερο από λίγους μήνες (Glodek, 1990). Τα χαρακτηριστικά των MCF-7 κυττάρων (Levenson et al., 1997,) συνοψίζονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των κυττάρων MCF-7

<b>Πρωτογενής όγκος</b>	Επιθετικό πορογενές καρκίνωμα μαστού
<b>Προέλευση κυττάρων</b>	Μεταστατικό καρκίνωμα
<b>Παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων</b>	Ναι
<b>Πολλαπλασιασμός ως απόκριση παρουσία οιστρογόνων</b>	Ναι
<b>Παρουσία υποδοχέων προγεστερόνης</b>	Ναι
<b>Υπερέκφραση Her2/neu</b>	Όχι
<b>Ογκογένεση σε ποντίκια</b>	Ναι, (μόνο παρουσία οιστρογόνων)
<b>Φαινότυπος-Μορφολογία</b>	Επιθηλιακού τύπου

Η ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7 αναστέλλεται από την παρουσία του παράγοντα TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) ενώ επώαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς με αντι-οιστρογόνα έχει τη δυνατότητα να ρυθμίσει την έκκριση αυξητικών παραγόντων που ομοιάζουν δομικά με την ινσουλίνη (insulin-like growth factor binding-proteins).



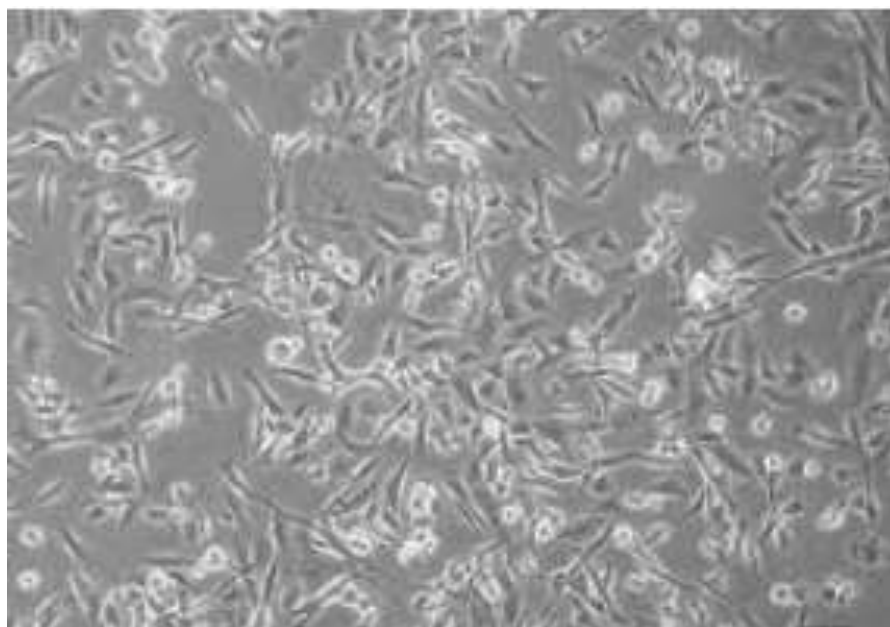
**Εικόνα 16:** Κύτταρα MCF-7 από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων

### 3.4. Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (ορμονοανεξάρτητα) (MDA-MB-231)

Τα κύτταρα MDA-MB-231 απομονώθηκαν για πρώτη φορά από μια Καυκάσια ασθενή. Τα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (Cailleau et al., 1974) συνοψίζονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά των κυττάρων MDA-MB-231

<b>Πρωτογενής όγκος</b>	Επιθετικό πορογενές καρκίνωμα μαστού
<b>Προέλευση κυττάρων</b>	Μεταστατικό καρκίνωμα
<b>Παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων</b>	Όχι
<b>Παρουσία υποδοχέων προγεστερόνης</b>	Όχι
<b>Υπερέκφραση Her2/neu</b>	Όχι
<b>Ογκογένεση σε ποντίκια</b>	Ναι



**Εικόνα 17:** Κύτταρα MDA-MB-231 από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων

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

### 3.5. Συντήρηση κυττάρων σε καλλιέργεια

Τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια μέσα σε επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες με εμβαδόν επιφανείας 25 cm<sup>2</sup> (T<sub>25</sub>) ή 75 cm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub>). Είναι σημαντικό σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας να αναγράφεται το πέρασμα (passage) της καλλιέργειας. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αποτελείται από το θρεπτικό μέσο DMEM ενισχυμένο με βόειο εμβρυϊκό ορό FBS (τελικής συγκέντρωσης 10% v/v στο θρεπτικό μέσο DMEM) και παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης (P) και στρεπτομυκίνης (S) σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/MI και 100 µg/mL αντίστοιχα στο θρεπτικό μέσο DMEM. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο ορός, πριν από τη χρήση του, απενεργοποιείται με θέρμανση στους 55°C για 30 min (heat inactivation) ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος στα κύτταρα της καλλιέργειας. Όλα τα αντιδραστήρια πριν από τη χρήση τους θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι να καλύψουν το 70%-80% της επιφάνειας της επίπεδης, πλαστικής, αποστειρωμένης φλάσκας. Το θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες κατά μέσο όρο ενώ η κατάσταση των κυττάρων της καλλιέργειας ελέγχεται καθημερινά σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (εταιρεία Kruss). Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο (εταιρείας RS BIOTECH) σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70%-80% της φλάσκας καλλιέργειας, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια και πέρασμα σε νέα φλάσκα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως θρυψινοποίηση. Η διαδικασία της θρυψινοποίησης στοχεύει τόσο στην αποκόλληση των κυττάρων από το στερεό τους υπόστρωμα όσο και στην μεταξύ τους αποκόλληση. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: αρχικά αφαιρείται από τη φλάσκα καλλιέργειας το πλήρες θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια μιας γυάλινης πιπέτας pasteurπροσαρμοσμένης σε αντλία κενού. Ακολουθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X) στην φλάσκα

καλλιέργειας σε ποσότητα η οποία ποικίλλει ανάλογα με το εμβαδόν της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας που χρησιμοποιείται. Ενδεικτικά, σε φλάσκα καλλιέργειας T<sub>25</sub> και T<sub>75</sub> προστίθενται 5 mL και 15 mL διαλύματος PBS, αντίστοιχα. Η προσθήκη του διαλύματος PBS στη φλάσκα καλλιέργειας και η ήπια ανακίνηση της στοχεύει στην έκπλυση των κυττάρων πριν από την επεξεργασία τους με θρυψίνη, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του ορού που περιέχονται στη φλάσκα καλλιέργειας και τα οποία δρουν ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου θρυψίνη. Ακολουθεί η αφαίρεση του διαλύματος PBS και η προσθήκη του ενζύμου θρυψίνη. Το ένζυμο θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης-θρεονίνης, της οποίας η ενεργότητα οδηγεί στην διάσπαση των συνδέσεων των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με το στερεό τους υπόστρωμα. Η ποσότητα του ενζύμου που προστίθεται ποικίλλει ανάλογα με το εμβαδόν επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας που χρησιμοποιείται. Ενδεικτικά, χρησιμοποιείται 1 mL θρυψίνης για την φλάσκα T<sub>25</sub> και 1,5 mL θρυψίνης για την φλάσκα T<sub>75</sub>. Προκειμένου να δράσει το ένζυμο, η φλάσκα καλλιέργειας τοποθετείται είτε στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>) για 5 min είτε διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται ήπια. Είναι πολλές φορές απαραίτητο να γίνει και επιπλέον μηχανική ανάδευση με αποστειρωμένη πιπέτα, ώστε να επιτευχθεί διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στην φλάσκα καλλιέργειας. Η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων παρακολουθείται μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολούθως στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο, ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη και πραγματοποιείται καλή ανάδευση των κυττάρων με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, ώστε να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Μια ποσότητα από το κυτταρικό εναιώρημα (ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο κυττάρων και με τις ανάγκες του πειράματος) μπορεί να μεταφερθεί σε νέα φλάσκα καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Ο τελικός όγκος του θρεπτικού μέσου είναι 5 mL για την φλάσκα T<sub>25</sub> και 15 mL για την φλάσκα T<sub>75</sub>. Οι φλάσκες καλλιέργειας διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>).

### **3.6. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας**

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας πραγματοποιείται μετά από ψύξη-πάγωμα σε ειδικά σωληνάρια (cryovials) για χρονικά διαστήματα μερικών μηνών στους -80°C ή για ακόμη μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σε



υγρό άζωτο. Η μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων γίνεται σε κρυοπροστατευτικό μέσο, το οποίο αποτελείται από πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM και DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητο τα κύτταρα να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα. Για αυτόν τον λόγο επιλέγονται για πάγωμα κύτταρα που καλύπτουν το 60% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας.

### **3.6.1. Πάγωμα κυττάρων**

Για το πάγωμα των κυττάρων η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη: αρχικά αφαιρείται από τη φλάσκα καλλιέργειας το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και προστίθεται το διάλυμα PBS (5 mL για την T<sub>25</sub>, 15 mL για την T<sub>75</sub>) με στόχο την έκπλυση των κυττάρων από υπολείμματα του ορού. Ακολουθεί η αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS και η προσθήκη του ενζύμου θρυψίνη (1 mL για την T<sub>25</sub>, 1,5 mL για την T<sub>75</sub>) και τα κύτταρα είτε τοποθετούνται για λίγα λεπτά στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>) για 5 min, είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να δράσει η θρυψίνη. Αφού ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και από την επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας, συνήθως με τη βοήθεια επιπρόσθετης μηχανικής ανάδευσης, προστίθεται πλήρες θρεπτικό μέσο, το οποίο αδρανοποιεί την θρυψίνη. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναδεύονται καλά και τοποθετούνται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 900 στροφές ανά min (rpm) για 5 min, σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε μέσο παγώματος (freezing medium). Το μέσο παγώματος περιέχει 10% v/v DMSO και 90% v/v πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM. Τα παγωμένα κύτταρα (1 mL περίπου) μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάρια (cryovials), τα οποία τοποθετούνται στους -20°C για 1-1,5 ώρες και εν συνεχεία στους -80°C ώστε η ψύξη να είναι σταδιακή. Για την αποθήκευση των κυττάρων για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τα σωληνάρια τοποθετούνται σε δοχείο, που περιέχει υγρό άζωτο. Σε κάθε cryovial πρέπει να αναγράφεται το είδος της κυτταρικής σειράς, ο αριθμός των περασμάτων (passage) και η ημερομηνία παγώματος.

### 3.6.2. Ξεπάγωμα κυττάρων

Το ξεπάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα μεταφέρονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  ή από το δοχείο υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  όπου αποψύχονται με συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό και αναδεύονται με χρήση πιπέτας, ώστε να αναμιχθούν πλήρως. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονται σε φλάσκες  $T_{25}$  ή  $T_{75}$  (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και τις ανάγκες του πειράματος), οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  σε σφαιρική 5%  $\text{CO}_2$ . Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DMSO που περιέχονται στο μίγμα παγώματος (freezing medium). Εναλλακτικά τα κύτταρα αφού αποψυχθούν και μεταφερθούν σε σωληνάριο τύπου falcon (που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό) μπορούν να φυγοκεντρηθούν και να επαναδιαλυθούν σε πλήρες θρεπτικό μέσο προτού μεταφερθούν σε νέα φλάσκα καλλιέργειας ( $T_{25}$  ή  $T_{75}$ ). Σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας είναι σημαντικό να αναγράφεται ο αριθμός περασμάτων (passage) κάθε κυτταρικής σειράς και ο τύπος της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται.

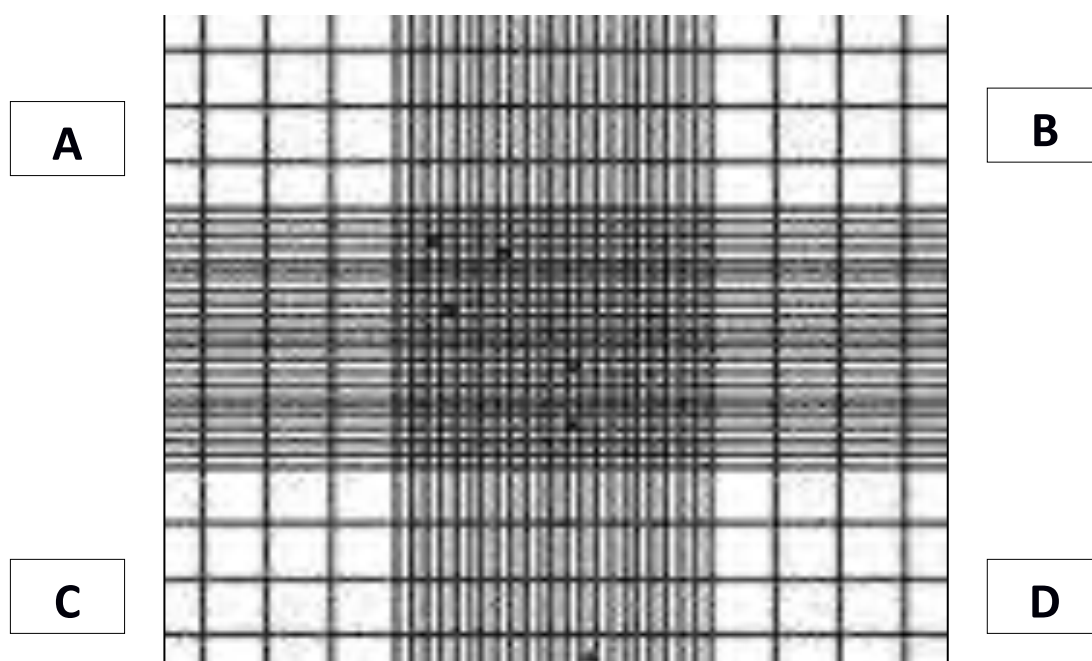
### 4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Προκειμένου να γίνει η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πριν τη διεξαγωγή ενός πειράματος τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS, επωάζονται με διάλυμα θρυψίνης και αποκολλώνται από τη φλάσκα καλλιέργειας. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 mL και φυγοκεντρώνται για 5 min στα 900 rpm στους  $20^{\circ}\text{C}$ . Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Τέλος 10  $\mu\text{L}$  από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρονται σε αιμοκυτταρόμετρο (πλακίδιο Neubauer) για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή

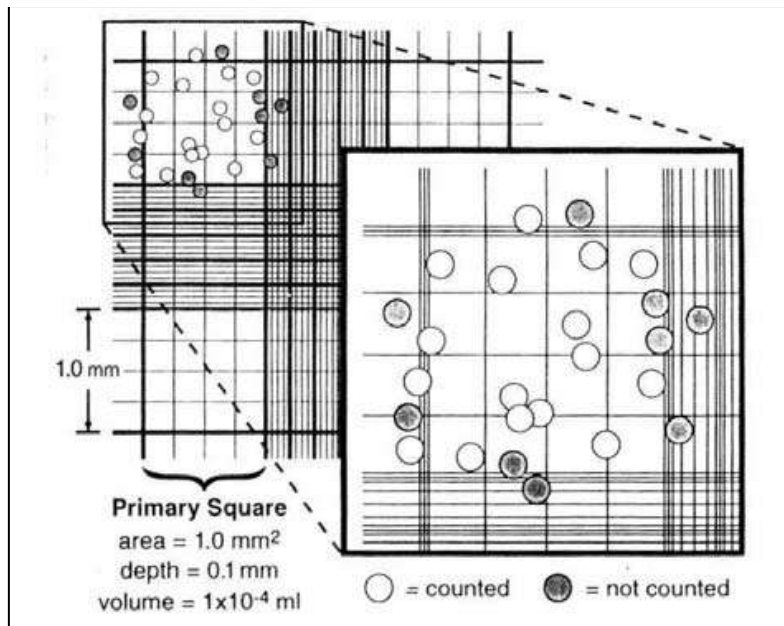
επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.

Κάθε μια από αυτές τις λείες επιφάνειες έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Τα υπόλοιπα τετράγωνα σχηματίζουν ένα σταυρό και το σχήμα αυτό βοηθά στον εντοπισμό των κυττάρων κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18:** Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου που βοηθά στη μέτρηση των κυττάρων

Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: μετράται ο συνολικός αριθμός των κυττάρων και στα 4 τετράγωνα (A,B,C,D) και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους  $(A+B+C+D/4)$  (Εικόνα 18). Στη συνέχεια ο μέσος όρος κυττάρων ανά τετραγωνάκι πολλαπλασιαζόμενος με  $10^4$  δίνει τον αριθμό των κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος.



**Εικόνα 19:** Σχηματική παρουσίαση του υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων στο πλακίδιο Neubauer

## 5. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης με τη μέθοδο ΧΤΤ

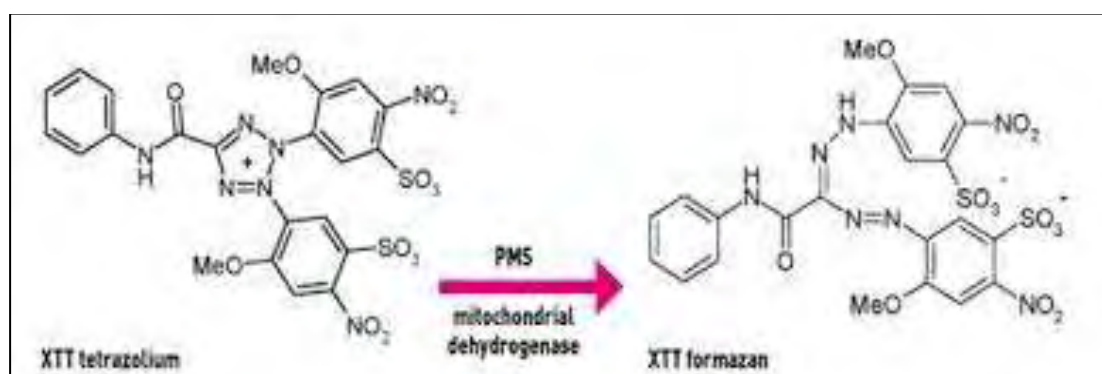
### 5.1. Αρχή της μεθόδου

Για τη μη-ραδιενεργή ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-sulforphenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxide). Χρησιμοποιήθηκε το cellproliferationkitII της εταιρείας Roche, το οποίο περιέχει 2 αντιδραστήρια: 1) το πορτοκαλί χρώματος αντιδραστήριο Α, το οποίο καλείται ΧΤΤ labeling reagent και περιέχει 1 mg/mL (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonicacidhydrate} σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 χωρίς την παρουσία της χρωστικής ερυθρό της φαινόλης και 2) το κίτρινου χρώματος αντιδραστήριο Β, το οποίο καλείται electron-coupling reagent και περιέχει 0,383 mg/mL PMS (N-methylidibenzopyrazinemethylsulfate) σε αποστειρωμένο PBS. Το αντιδραστήριο Β (PMS) χρησιμεύει ως ο δότης ηλεκτρονίων στην αντίδραση της Εικόνας 20.

Το ΧΤΤ συντέθηκε το 1988 από τον Paull και τους συναδέλφους του (Paull et al., 1988) και η μέθοδος περιγράφηκε πρώτα από τον Scudiero και τους συνεργάτες του (Scudiero et al., 1988) ενώ βελτιώθηκε μέσα στα επόμενα

χρόνια και από άλλους ερευνητές (Roehm et al., 1991; Jost et al., 1992). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα διάσπασης του κίτρινου άλατος τετραζολίου ΧΤΤ και στον σχηματισμό της φορμαζάνης, που είναι μια υδατοδιαλυτή χρωστική πορτοκαλί χρώματος σε μεταβολικά ενεργά και συνεπώς ζωντανά κύτταρα, από μιτοχονδριακά ένζυμα, τις αφυδρογονάσες (Εικόνα 20). Η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων συνεπάγεται αύξηση της δραστηριότητας των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στο δείγμα. Αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται, η οποία μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader). Αυτό διασφαλίζει υψηλό βαθμό ακρίβειας και άμεση επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τον υπολογιστή, γεγονός που καθιστά δυνατό τον γρήγορο και εύκολο χειρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν άλλα άλατα τετραζολίου (π.χ. ΜΤΤ) είναι ακριβώς το γεγονός ότι η διάσπαση του ΧΤΤ δίνει μια υδατοδιαλυτή ένωση και έτσι δεν απαιτείται το βήμα της διαλυτοποίησης. Επίσης, πρόκειται για μια μέθοδο εύκολη και ασφαλή καθώς εξαλείφει την χρήση ραδιενεργών ισotόπων, επιπρόσθετων αντιδραστηρίων και σταδίων έκπλυσης, ιδιαίτερα ευαίσθητη και ακριβή καθώς αφ'ενός ανιχνεύει ακόμη και πολύ μικρούς αριθμούς κυττάρων και αφ'ετέρου παρατηρείται υψηλή συσχέτιση ανάμεσα στις λαμβάνουσες τιμές απορρόφησης από την φασματοφωτομέτρηση και στον υπάρχοντα αριθμό κυττάρων. Η μέθοδος ΧΤΤ βρίσκει εφαρμογή στην εξέταση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκινίνες ή θρεπτικές ουσίες αλλά και στη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας.

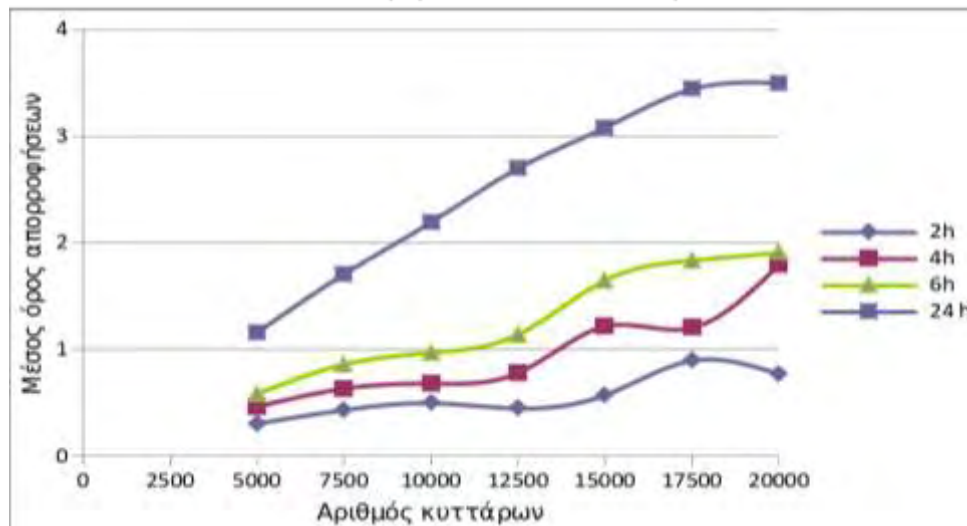


**Εικόνα 20:** Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτό άλας φορμαζάνης

## 5.2. Προσδιορισμός της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο ΧΤΤ

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ διαρκεί 3 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate) (Εικόνα 21). Την επόμενη ημέρα ξεκινάει η επώαση των κυττάρων με τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα και μετά από 24 ώρες (την τρίτη ημέρα) γίνεται η προσθήκη του αντιδραστηρίου ΧΤΤ και ακολουθεί φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader) για την εκτίμηση της κυτταρικής ανάπτυξης μετά την παρέλευση συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος διαφορετικού για κάθε κυτταρική σειρά.

Αναλυτικά την πρώτη ημέρα του πειράματος πραγματοποιείται η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Για την επιλογή του κατάλληλου αριθμού κυττάρων καθώς και την επιλογή του κατάλληλου αριθμού ωρών επώασης με το ΧΤΤ, ανάλογα και με τον τύπο της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται, πρέπει προηγουμένως να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα τιτλοδότησης στο οποίο μελετάται η ανάπτυξη διαφορετικού αριθμού κυττάρων, σε συνδυασμό με διαφορετικές ώρες επώασης με το αντιδραστήριο ΧΤΤ. Επιλέγεται εκείνος ο συνδυασμός ωρών επώασης-αριθμού κυττάρων, κατά τον οποίο παρατηρείται γραμμική ανάπτυξη των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μόνο το πείραμα τιτλοδότησης για τα κύτταρα MDA-MB-231 (Γράφημα 1) καθώς τα πειράματα τιτλοδότησης των υπολοίπων κυτταρικών σειρών είχαν ήδη πραγματοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες στο πλαίσιο άλλων διπλωματικών εργασιών στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά την πειραματική διαδικασία τα κύτταρα πρέπει να διαθέτουν έναν καλό μεταβολικό ρυθμό, κάτι το οποίο παρατηρείται όταν καλύπτουν ομοιόμορφα το 40%-60% του πιάτου της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα για τα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκαν 11.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι (4 ώρες επώασης με το ΧΤΤ), για τα κύτταρα HepG<sub>2</sub> 25.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι (4 ώρες επώασης με το ΧΤΤ), για τα κύτταρα MCF-7 12.500 κύτταρα ανά πηγαδάκι (4 ώρες επώασης με το ΧΤΤ) και για τα MDA-MB-231 11.000 κύτταρα ανά πηγαδάκι (2 ώρες επώασης με το ΧΤΤ).



**Γράφημα 1:** Γραφική παράσταση της μεταβολής της απορρόφησης από κύτταρα MDA-MB-231 σε συνάρτηση με τον αριθμό τους, σε χρονικά διαστήματα 2, 4, 6 και 24 ωρών

Μετά την θρυψινοποίηση των κυττάρων και τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος υπολογίζεται ο όγκος που περιέχει τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων, στα οποία προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/mL και 100 μg/mL αντίστοιχα) και με FBS (σε τελική συγκέντρωση 10% v/v) σε τελικό όγκο 150 μL. Τα κύτταρα τοποθετούνται στα πηγαδάκια του τρυβλίου 96 θέσεων και επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> μέχρι την επόμενη ημέρα, ώστε να προσκολληθούν στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας.



**Εικόνα 21:** Τρυβλίο 96 θέσεων (96-wellplate)

Την δεύτερη ημέρα πραγματοποιείται η προσθήκη των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στα κύτταρα. Για κάθε πηγαδάκι ετοιμάζεται μίγμα, το οποίο περιέχει θρεπτικό υλικό DMEM, απουσία ορού, με αντιβιοτικά και το υπό εξέταση εκχύλισμα σε τελικό όγκο 100  $\mu$ L. Για όλα τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκε η ίδια τελική συγκέντρωση (12,5 mg/ml) που δημιουργήθηκε με αραιώση από το αρχικό διάλυμα (stock) των 200 mg/ml (τουλάχιστον εις διπλούν). Αρχικά απομακρύνεται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό από το κάθε πηγαδάκι και προστίθενται στα κύτταρα 100  $\mu$ l από το κάθε δείγμα. Επιπρόσθετα κάθε πείραμα περιελάμβανε και τα ακόλουθα δείγματα i) δείγματα control, δηλαδή κύτταρα τα οποία επωάζονται παρουσία DMEM και αντιβιοτικών, απουσία ορού και εκχυλισμάτων (τουλάχιστον εις τριπλούν) και ii) δείγμα «θετικού ελέγχου», δηλαδή κύτταρα που επωάζονται παρουσία του αντικαρκινικού φαρμάκου ετοποσίδη σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu$ M, όπου αναμένεται πλήρης κυτταρικός θάνατος. Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, όπου τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες.

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Roche, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αναλογία των αντιδραστηρίων A και B, που περιέχονται στο kit πρέπει να είναι 50:1, επομένως πριν την χρήση του αντιδραστηρίου ΧΤΤ τα αντιδραστήρια A και B αναμιγνύονται στη συγκεκριμένη αναλογία. Η ποσότητα του αντιδραστηρίου ΧΤΤ, που προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι είναι ίση με 50  $\mu$ l. Αφού γίνει η προσθήκη του



αντιδραστηρίου ΧΤΤ το τρυβλίο τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C , σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, όπου τα κύτταρα επωάζονται για 2 ή 4 ώρες, ανάλογα με τον τύπο της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450 και 630 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek).

### **5.3. Προσδιορισμός της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων τραχήλου της μήτρας (HeLa) ύστερα από διαφορετικούς χρόνους επώασης με το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup>**

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ανάπτυξης κυττάρων HeLa ύστερα από διαφορετικούς χρόνους επώασης με το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ διαρκεί 2 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού (11.000) κυττάρων HeLa σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate) (εικόνα 22) και την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επωάζονται με τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα για 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 και 4 ώρες. Ακολουθεί προσθήκη του αντιδραστηρίου ΧΤΤ και επώαση για 4 ώρες και φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο ELISA (multi-well ELISA reader) σε μήκη κύματος 450 και 630 nm, για την εκτίμηση της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Η πειραματική διαδικασία έχει περιγραφεί αναλυτικά στην ενότητα 5.2.

### **5.4. Προσδιορισμός της επίδρασης του αναστολέα της κασπάσης 3 στην δράση του εκχυλίσματος των φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa)**

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται η επίστρωση κυττάρων HeLa (11.000) σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate) (Εικόνα 21).

Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν για μία ώρα (έγιναν πειράματα χρησιμοποιώντας 2 ώρες επώασης που έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα) με τον αναστολέα της κασπάσης 3, σε τελική συγκέντρωση 200 μΜ, και στη συνέχεια προστέθηκε το υπό μελέτη εκχύλισμα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 1 ώρα (χρονικό διάστημα που καθορίστηκε με βάση τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται στην ενότητα 5.3.) και ακολούθως προστέθηκε ΧΤΤ και μετά από 4 ώρες επώασης μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκη κύματος 450 και 630 nm για την εκτίμηση της κυτταρικής επιβίωσης.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ως δείγματα ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που περιέχουν κύτταρα τα οποία επωάζονται παρουσία DMEM, αντιβιοτικών, εκχυλισμάτων και DMSO (σε ποσότητα ίση με αυτή του αναστολέα της κασπάσης), απουσία ορού και εκχυλισμάτων. Τέλος, τα υπό μελέτη δείγματα περιέχουν κύτταρα που επωάζονται παρουσία DMEM, αντιβιοτικών, αναστολέα και εκχυλισμάτων, απουσία ορού.

## 6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων πραγματοποιείται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με σκοπό τον υπολογισμό του ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης που προκαλεί το κάθε εκχύλισμα σε κάθε κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων σε μήκη κύματος 450 και 630 nm, το επί της εκατό (%) ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα control δίνεται από τον ακόλουθο τύπο::

$$\frac{O.D.control - O.D.average}{O.D.control} \times 100$$

Όπου:

**O.D. control average:** ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων ελέγχου. Η απορρόφηση του κάθε δείγματος ελέγχου (control) υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα (απουσία εκχυλίσματος).

**O.D. average:** ο μέσος όρος της τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος, η οποία υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm για κάθε δείγμα της ίδιας μεταχείρισης.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

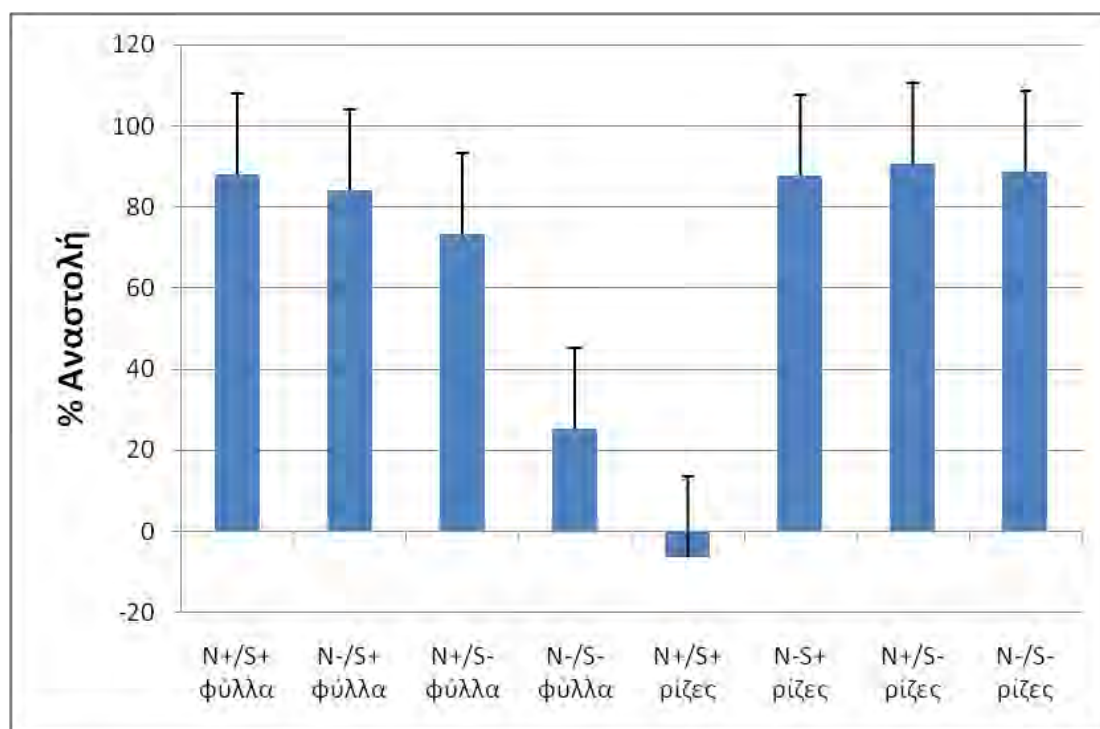
Το φυτό ρόκα (*Eruca sativa*) αναπτύχθηκε με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους, όσον αφορά τις συνθήκες θειούχου και αζωτούχου λίπανσης. Συγκεκριμένα στην πρώτη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση που ήταν πλήρης σε άζωτο και θείο ( $N^+/S^+$ ), στη δεύτερη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση με πλήρες άζωτο αλλά μειωμένο θείο ( $N^+/S^-$ ), στην τρίτη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση με πλήρες θείο αλλά μειωμένο άζωτο ( $N^-/S^+$ ) ενώ στην τελευταία μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε λίπανση με μειωμένο άζωτο και θείο ( $N^-/S^-$ ). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι διαφορετικές συνθήκες λίπανσης επιδρούν στη συγκέντρωση των γλυκοσινολικών οξέων στα διάφορα τμήματα του φυτού (φύλλα και ρίζες) και αναμένεται οι διαφορές αυτές να επιδράσουν με διαφορετικό τρόπο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (κύτταρα HeLa), των καρκινικών ηπατικών κυττάρων (κύτταρα HepG<sub>2</sub>), και των καρκινικών κυττάρων μαστού (κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231).

Τα κύτταρα HeLa επώαστηκαν για 24 ώρες με τα διαφορετικά εκχυλίσματα και εκτιμήθηκε η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας 2-tailed, 2-type t-test (Γράφημα 2). Αναλυτικά η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό ύστερα από την επώασή τους με τα εκχυλίσματα των ριζών των μεταχειρίσεων  $N^-/S^+$ ,  $N^-/S^-$  και  $N^+/S^-$  (ποσοστά αναστολής 90,6%, 88,7% και 87,6% αντίστοιχα), με τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων  $N^+/S^+$ ,  $N^+/S^-$ ,  $N^-/S^+$  (ποσοστά αναστολής 87,9%, 84,1% και 73,4% αντίστοιχα) και σε μικρότερο αλλά στατιστικά σημαντικό βαθμό από το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης  $N^-/S^-$  (ποσοστό αναστολής 25,2%) ενώ το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης  $N^+/S^+$  βρέθηκε ότι έχει την τάση να επάγει την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά σε μη στατιστικά σημαντικό βαθμό.

Συνολικά παρατηρείται ότι η ανάπτυξη των κυττάρων HeLa επηρεάζεται μετά την επώαση με τα εκχυλίσματα των ριζών με τον ίδιο τρόπο και στον ίδιο περίπου βαθμό με εξαίρεση το εκχύλισμα της μεταχείρισης  $N^+/S^+$ , το οποίο φαίνεται ότι δεν επιδρά στην κυτταρική ανάπτυξη. Συνεπώς η απουσία N ή S ή και των δύο από τα φυτά προάγει το σχηματισμό πιο δραστικών εκχυλισμάτων από τις ρίζες της ρόκας.

Από την άλλη, η επώαση των κυττάρων HeLa με τα εκχυλίσματα των φύλλων των διαφορετικών μεταχειρίσεων επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό την κυτταρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων  $N^+/S^+$ ,  $N^+/S^-$  προκαλούν υψηλή αναστολή της ανάπτυξης, στον ίδιο βαθμό που προαναφέρθηκε για τα πιο δραστικά εκχυλίσματα των ριζών.

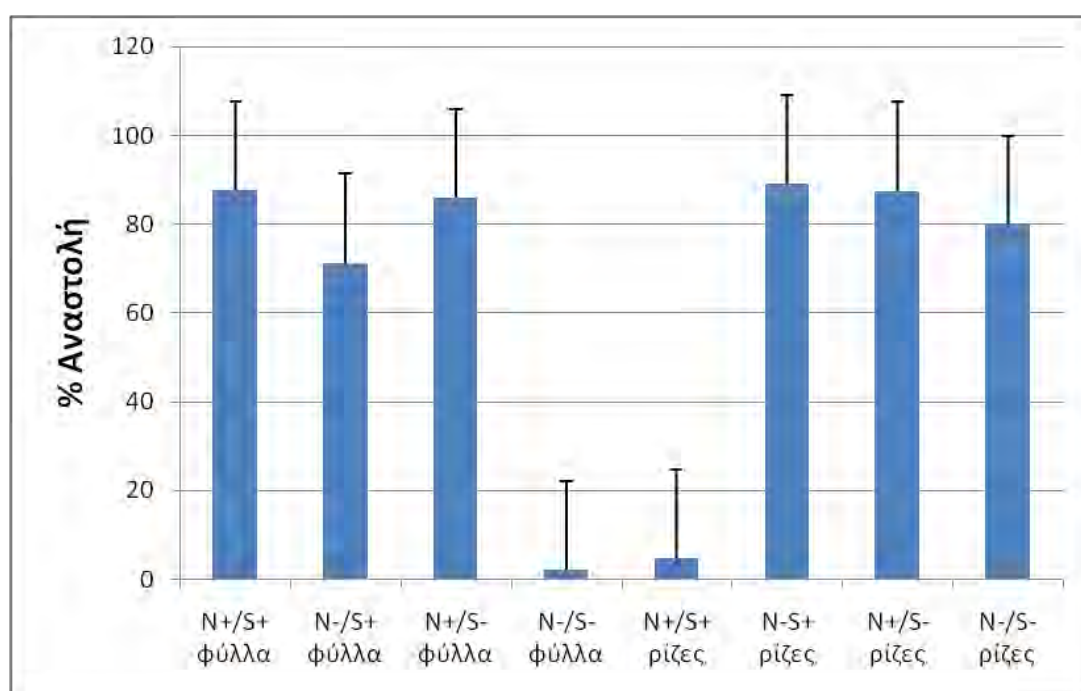
Σημαντική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης προκαλεί τα εκχύλιμα των φύλλων της μεταχειρίσης όπου απουσιάζει μόνο το N, αλλά όχι το θείο, ενώ το εκχύλιμα των φύλλων από φυτά που μεγαλώνουν απουσία θείου και αζώτου έχει την μικρότερη δραστικότητα στην ανάπτυξη των κυττάρων HeLa.



**Γράφημα 2:** Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από τα εξεταζόμενα φυτικά εκχύλισματα

Ομοίως κύτταρα HepG<sub>2</sub> επώαστηκαν για 24 ώρες με τα φυτικά εκχύλισματα των φύλλων και των ριζών όλων των μεταχειρίσεων και εκτιμήθηκε η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (Γράφημα 3). Αναλυτικά, η ανάπτυξη των κυττάρων HepG<sub>2</sub> αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό ύστερα από την επώασή τους με τα εκχύλισματα των φύλλων των μεταχειρίσεων N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>/S<sup>-</sup> και N<sup>-</sup>/S<sup>+</sup> (ποσοστά αναστολής 87,6%, 86% και 71,3% αντίστοιχα) και τα εκχύλισματα των ριζών των μεταχειρίσεων N<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>/S<sup>+</sup> και N<sup>-</sup>/S<sup>-</sup> (ποσοστά αναστολής 87,5%, 89,2% και 79,9% αντίστοιχα). Αντιθέτως, το εκχύλιμα των φύλλων της μεταχείρισης N<sup>-</sup>/S<sup>-</sup> και το εκχύλιμα ριζών της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> φαίνεται ότι δεν επιδρούν στην κυτταρική ανάπτυξη (αναστολή σε μη στατιστικά σημαντικά ποσοστά 2,2% και 4,8% αντίστοιχα).

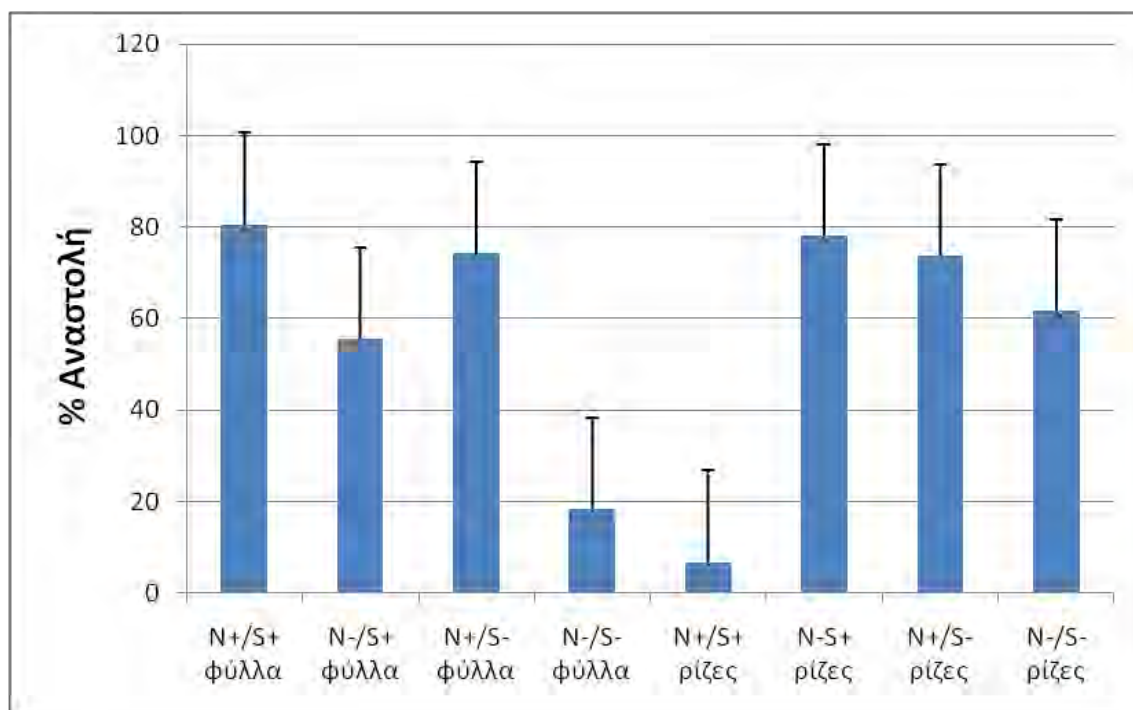
Είναι εμφανές ότι τα εκχυλίσματα φύλλων από φυτά ρόκας που μεγαλώνουν παρουσία κανονικού N και S, ή παρουσία ενός εκ δύο αυτών συστατικών είναι εξαιρετικά δραστικά, και η ταυτόχρονη απουσία N και S οδηγεί σε απώλεια της δραστηριότητας των εκχυλισμάτων αυτών. Αναφορικά με τα εκχυλίσματα των ριζών, φαίνεται ότι η απουσία N ή S ή και των δύο από τα φυτά προάγει το σχηματισμό πιο δραστικών εκχυλισμάτων, συγκριτικά με συνθήκες κανονικής θρέψης N και S.



**Γράφημα 3:** Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HepG<sub>2</sub> από τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα

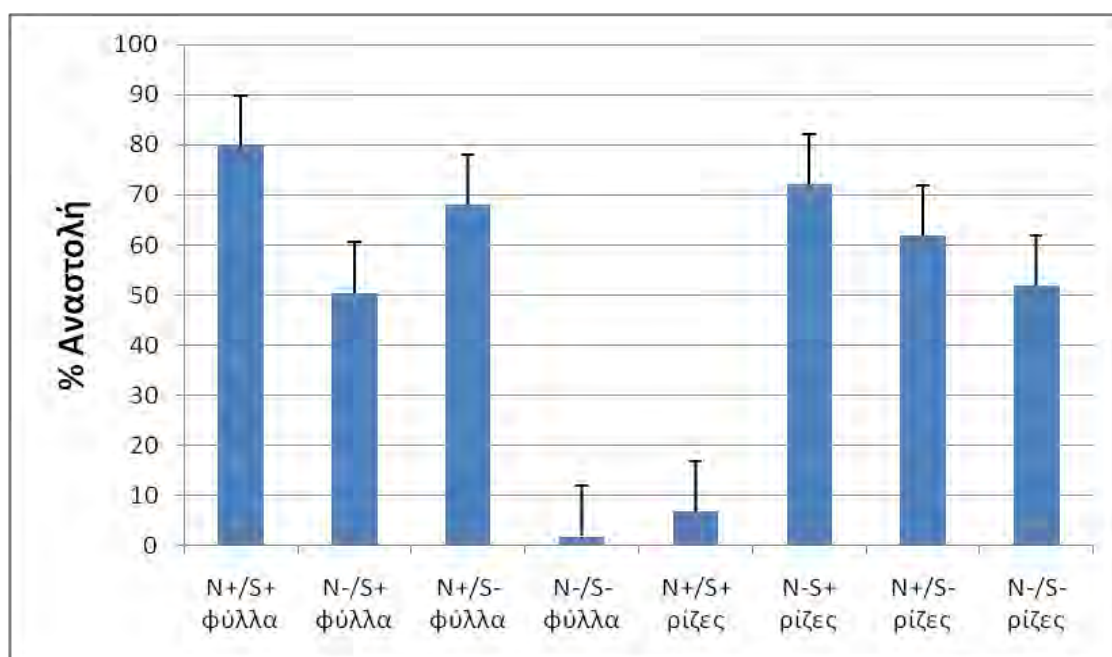
Ακολούθως πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων MCF-7 για 24 ώρες με τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα για την εκτίμηση της επίδρασής τους στην κυτταρική ανάπτυξη.

Βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων  $N^+/S^+$  και  $N^+/S^-$  προκαλούν την μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (με ποσοστά 80,57% και 74,23% αντίστοιχα). Μικρότερη αναστολή, σε ποσοστό 55,53%, προκαλεί το εκχύλισμα της μεταχείρισης  $N^-/S^+$  ενώ την χαμηλότερη αλλά στατιστικώς σημαντικά αναστολή προκαλεί το εκχύλισμα φύλλων των μεταχείρισης  $N^-/S^-$  (ποσοστό 18,35%) (Γράφημα 4). Αναφορικά με τα εκχυλίσματα των ριζών, βρέθηκε ότι τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν αυτά των μεταχειρίσεων  $N^+/S^-$ ,  $N^-/S^+$  και  $N^-/S^-$  (ποσοστά αναστολής 73,76%, 78,09% και 61,75% αντίστοιχα), ενώ το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης  $N^+/S^+$  έδειξε την τάση να επάγει την κυτταρική ανάπτυξη, σε μη στατιστικά σημαντικό ποσοστό (6,79%) (Γράφημα 4).



**Γράφημα 4:** Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MCF-7 από τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα

Εκτός από τα ορμονο-εξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην ανάπτυξης της μη ορμονο-εξαρτώμενης σειράς MDA-MB-231. Η 24-ωρη επώαση των κυττάρων με τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα έδωσε τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο Γράφημα 5. Αναλυτικά, η ανάπτυξη των κυττάρων MDA-MB-231 αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από το εκχυλίσματα των φύλλων των μεταχειρίσεων  $N^+/S^+$ ,  $N^+/S^-$  και  $N^-/S^+$  (ποσοστά αναστολής 79,89%, 68% και 61,8% αντίστοιχα). Αντίθετα, το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης  $N^-/S^-$  δεν προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, καθώς το ποσοστό αναστολής εκτιμάται στο 1,9%, τιμή που δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αναφορικά με τα εκχυλίσματα των ριζών, τα πιο δραστικά εκχυλίσματα ήταν αυτά των μεταχειρίσεων  $N^-/S^+$  (ποσοστό αναστολής 72,1%),  $N^+/S^-$  (ποσοστό αναστολής 61,8%) και  $N^-/S^-$  (ποσοστό αναστολής 51,9%). Αντιθέτως, το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης  $N^+/S^+$  έδειξε την τάση να επάγει την κυτταρική ανάπτυξη, σε μη στατιστικά σημαντικό ποσοστό (6,8%) (Γράφημα 5).



**Γράφημα 5:** Αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων MDA-MB-231 από τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα

Η μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 και MDA-MB-231 οδήγησε σε παρόμοια συμπεράσματα. Συνολικά, είναι εμφανές ότι η παρουσία N ή S ή και των δύο στην λίπανση των φυτών επηρεάζει τη σύσταση των εκχυλισμάτων των φύλλων και οδηγεί σε παραγωγή αρκετά δραστικών εκχυλισμάτων, ενώ η απουσία και των δύο συστατικών μειώνει δραματικά την δραστικότητα των εκχυλισμάτων έναντι των καρκινικών κυττάρων μαστού. Αντιθέτως, η ταυτόχρονη παρουσία του N και του S οδηγεί στην παραγωγή ελάχιστα δραστικών εκχυλισμάτων ριζών, συγκριτικά με τα εξαιρετικά δραστικά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν απουσία μόνο του N, ή μόνο του S ή την ταυτόχρονη απουσία και των δύο αυτών συστατικών.

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους (ολική συγκέντρωση και σύσταση) σε γλυκοσινολικά οξέα. Στους πίνακες 4 και 5 φαίνεται η επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών αλειφατικών, ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ σε φύλλα και ρίζες ρόκας.

**Πίνακας 4:** Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ (μmol/gdw) σε φύλλα ρόκας

Δόση N	Δόση S	GRA	GNA	GSV	GER	GBS	4-MeO GBS	Ολικά Αλειφατικά	Ολικά Ινδολικά	Ολικά ΓΚΣ
+N	+S	7.90	2.80	7.56	4.00	0.72	0.69	22.27	1.41	23.68
-N	+S	8.09	2.08	6.82	4.20	0.50	0.28	21.19	0.78	21.97
+N	-S	3.82	0.13	2.62	1.98	0.44	0.17	8.56	0.61	9.17
-N	-S	4.71	0.17	3.19	1.42	0.14	0.12	9.48	0.26	9.74

**GRA: Glucoraphanin, GNA: Gluconapin, GSV: Glucosativin, GER: Glucoerucin, GBS: Glucobrassicin**



**Πίνακας 5:** Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Αρωματικών ΓΚΣ (μmol/gdw) σε ρίζες ρόκας

Δόση N	Δόση S	GRA	GER	GST	Ολικά Αλειφατικά	Ολικά Αρωματικά	Ολικά ΓΚΣ
+N	+S	9.12	25.99	3.08	35.11	3.07	38.18
-N	+S	3.77	7.07	1.77	10.84	1.76	12.61
+N	-S	1.21	3.92	1.22	5.13	1.21	6.34
-N	-S	1.03	4.31	0.73	5.34	0.72	6.07

**GRA: Glucoraphanin, GER: Glucoerucin, GST: Gluconasturtiin**

Είναι εμφανές από τους πίνακες 4 και 5 ότι τα εκχυλίσματα των διαφορετικών μεταχειρίσεων στους διαφορετικούς ιστούς διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε γλυκοσινολικά οξέα. Τα εκχυλίσματα των φύλλων περιέχουν αλειφατικά και ινδολικά γλυκοσινολικά οξέα, ενώ τα εκχυλίσματα των ριζών αλειφατικά και αρωματικά γλυκοσινολικά οξέα. Αναλυτικά, τα αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα που εντοπίζονται τόσο στα εκχυλίσματα φύλλων όσο και ριζών είναι η γλυκοραφανίνη (Glucoraphanin, GRA) και η γλυκοερουκίνη (Glucoerucin, GER), ενώ μόνο στα εκχυλίσματα των φύλλων περιέχονται τα αλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα, γλυκοναπίνη (Gluconaparin, GNA) και γλυκοσατιβίνη (Glucosativin, GSV). Επίσης, μόνο στα εκχυλίσματα των φύλλων περιέχεται το ινδολικό γλυκοσινολικό οξύ, γλυκομπρασσικίνη (Glucobrassicin-GBS) και η 4-MeO-GBS, ενώ μόνο στα εκχυλίσματα των ριζών περιέχεται το αρωματικό γλυκοσινολικό οξύ, γλυκοναστουρτίνη (Gluconasturtiin, GST).

Είναι πιθανό το διαφορετικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων (συγκέντρωση και σύσταση σε μεμονωμένα γλυκοσινολικά) να συσχετίζεται σε κάποιο βαθμό με τη διαφορετική επίδραση τους στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η ολική συγκέντρωση των εκχυλισμάτων σε γλυκοσινολικά οξέα φαίνεται ότι σε κάποιες περιπτώσεις επαρκεί αλλά σε άλλες περιπτώσεις δεν επαρκεί για να εξηγήσει τη διαφορετική τους δραστηριότητα. Για παράδειγμα το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup>, με τα υψηλότερα ολικά γλυκοσινολικά (αλειφατικά και ινδολικά), είναι το πιο δραστικό, και το εκχύλισμα της μεταχείρισης N<sup>-</sup>/S<sup>-</sup>, που περιέχει τα λιγότερα ολικά ινδολικά γλυκοσινολικά και, είναι το λιγότερο δραστικό από όλα τα εκχυλίσματα των

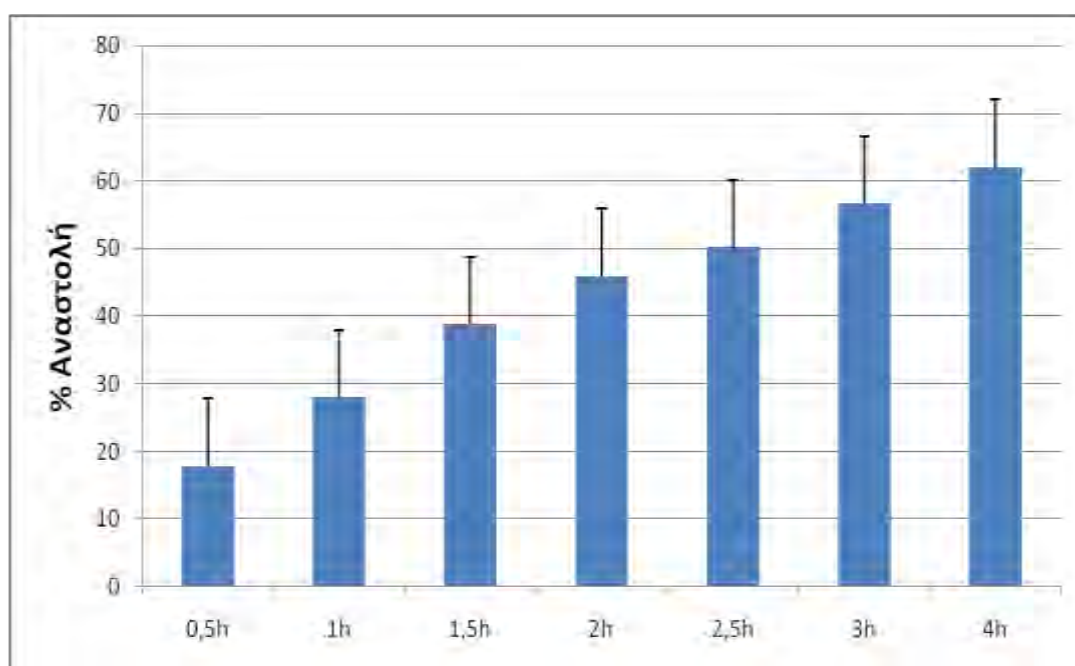
φύλλων. Αντιθέτως το εκχύλισμα των ριζών  $N^+/S^+$ , με τα υψηλότερα ολικά γλυκοσινολικά είναι το λιγότερο δραστικό από όλα τα εκχυλίσματα των ριζών. Επίσης, το εκχύλισμα των ριζών της μεταχείρισης  $N^-/S^-$  που χαρακτηρίζεται από την μικρότερη συγκέντρωση ολικών γλυκοσινολικών, προκαλεί μεγάλη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Είναι εμφανές από τους πίνακες 4 και 5 ότι η απουσία θείου μειώνει το ποσοστό των ολικών γλυκοσινολικών οξέων τόσο στα εκχυλίσματα των φύλλων όσο και των ριζών. Εντούτοις, αυτό δεν συσχετίζεται με την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Από την άλλη είναι πιθανό η σύσταση των εκχυλισμάτων σε μεμονωμένα γλυκοσινολικά να συσχετίζεται με την δράση τους στην ανάπτυξη των κυττάρων. Ενδεικτικά, η μικρότερη κυτταροτοξική δράση που προκαλεί το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης  $N^-/S^-$ , συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα φύλλων, μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην μικρότερη συγκέντρωση των ολικών και μεμονωμένων ινδολικών γλυκοσινολικών οξέων και του αλειφατικού γλυκοσινολικού οξέος, γλυκοερουκίνη που διαθέτει.

Επιπλέον, σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα των ριζών των μεταχειρίσεων απουσία N, ή S ή και των δύο, που εμφανίζουν υψηλή κυτταροτοξική δράση, το εκχύλισμα ριζών της μεταχείρισης  $N^+/S^+$  φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη καμίας από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Το εκχύλισμα αυτό διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση ολικών και μεμονωμένων αλειφατικών (ειδικά της γλυκοερουκίνης) και αρωματικών γλυκοσινολικών οξέων συγκρινόμενο με τα εκχυλίσματα ριζών των άλλων μεταχειρίσεων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ότι και άλλοι παράγοντες ή συστατικά των εκχυλισμάτων, εκτός από την περιεκτικότητα (συγκέντρωση και σύσταση) σε γλυκοσινολικά οξέα, πιθανώς θα πρέπει να διερευνηθούν για να εξηγήσουν ικανοποιητικά τη δραστικότητα των εκχυλισμάτων. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να επηρεάζουν ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, το μονοπάτι μετάδοσης σήματος των MAPK κινασών και η πορεία του κυτταρικού κύκλου (Wu et al., 2009). Θα πρέπει να επισημάνουμε το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα περιέχουν περισσότερο από ένα διαφορετικά γλυκοσινολικά οξέα, καθένα από τα οποία μπορεί να δρα μέσω κοινών ή ανεξάρτητων μεταξύ τους μονοπατιών, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη συσχέτιση του περιεχομένου τους σε γλυκοσινολικά οξέα με την επίδρασή τους στην κυτταρική ανάπτυξη. Τα πιο δραστικά εκχυλίσματα σε όλες τις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν ήταν αυτά των φύλλων, και ειδικά της μεταχείρισης παρουσία κανονικού N

και S. Αποφασίσαμε να μελετήσουμε τον πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου το συγκεκριμένο εκχύλισμα ασκεί τη δράση του, και λόγω του γεγονότος ότι φαίνεται ότι ίσως ο ίδιος μηχανισμός να εμπλέκεται στην αντικαρκινική του δράση σε όλες τις κυτταρικές σειρές, επικεντρωθήκαμε στην μελέτη της πιθανότητας ο μηχανισμός αυτός να αφορά την επαγωγή της απόπτωσης. Για τα πειράματα αυτά εστιαστήκαμε σε μια καρκινική σειρά, τα κύτταρα HeLa.

Αρχικά, κύτταρα HeLa επώαστηκαν με τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα για διάστημα από 0.5 έως και 4 ώρες και όπως είναι εμφανές στο Γράφημα 6, η ανάπτυξη των κυττάρων αναστέλλεται όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης τους με το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup>. Συγκεκριμένα, η κυτταρική ανάπτυξη αναστέλλεται σε ποσοστά 17,85%, 27,98%, 38,82%, 45,92%, 50,15%, 56,61% και 62,09% μετά από 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 και 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα των φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup>.

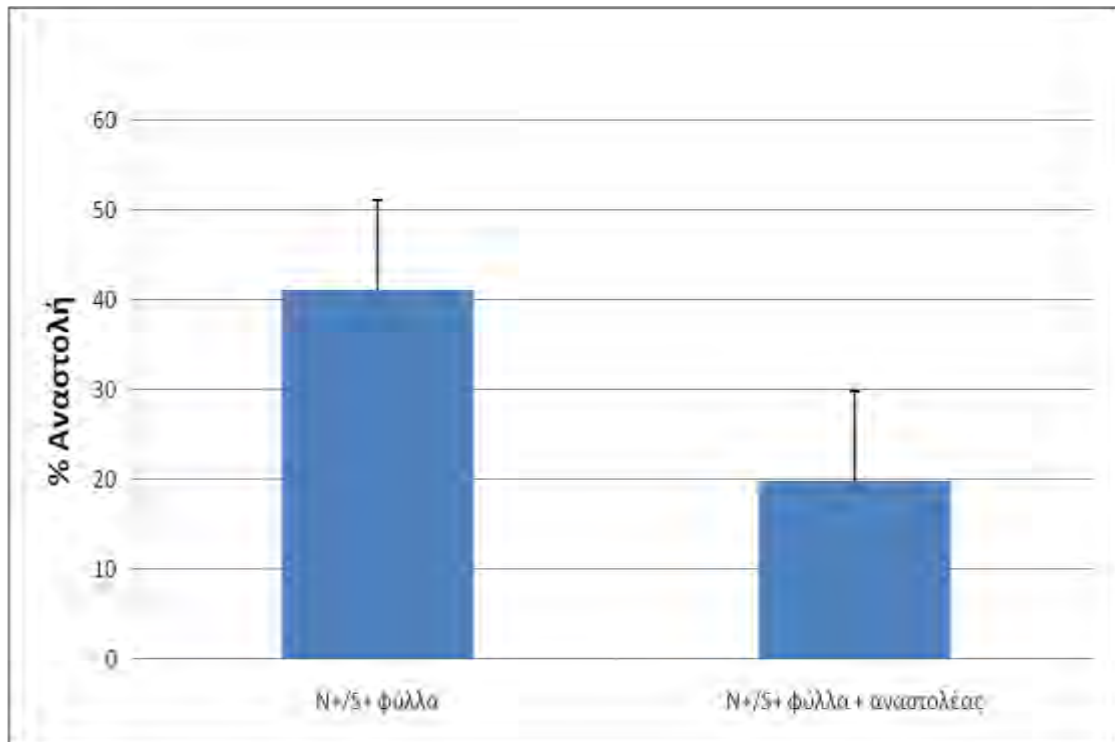


**Γράφημα 6:** % αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων HeLa από το εκχύλισμα φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> σε χρονικό διάστημα 4 ωρών

Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι η ανασταλτική επίδραση του εκχυλίσματος (σε ποσοστό κοντά στο 30%) εκδηλώνεται σε χρονικό διάστημα εντός της μιας ώρας από τη χορήγησή του, και αυτός ο χρόνος επιλέχθηκε

περαιτέρω για την διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου πιθανώς να ασκεί τη δράση του.

Στο τελευταίο στάδιο μελετήθηκε αν η επίδραση ενός ειδικού αναστολέα της κασπάσης 3 (Ac-DEVD-CHO) μπορεί να προκαλέσει αναστολή της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος των φύλλων της μεταχείρισης  $N^+/S^+$ . Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, κύτταρα HeLa προ-επώασθησαν παρουσία 200 mM του αναστολέα της κασπάσης 3, για μία ώρα, και ακολούθησε προσθήκη του συγκεκριμένου εκχυλίσματος και επιπλέον επώαση για ώρα, προτού εκτιμηθεί το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης με τη χρήση της μεθόδου ΧΤΤ (προσθήκη αντιδραστηρίου ΧΤΤ, επώαση για 4 ώρες και φωτομέτρηση στα 450 και 630 nm). Στο γράφημα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα του εκατοστιαίου ποσοστού της αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων HeLa από το συγκεκριμένο εκχύλισμα των φύλλων, παρουσία και απουσία του αναστολέα Ac-DEVD-CHO. Είναι εμφανές ότι η παρουσία του συγκεκριμένου αναστολέα μειώνει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης που προκαλείται από το συγκεκριμένο εκχύλισμα (ποσοστό 41,1% απουσία αναστολέα και 19,8% παρουσία αναστολέα). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η δράση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος αφορά στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης 3, καθώς η κυτταροτοξική αυτή δράση μπορεί σε μεγάλο βαθμό να αναστραφεί με την αναστολή της συγκεκριμένης κασπάσης.



**Γράφημα 7:** % αναστολή της αποπτωτικής δράσης του εκχυλίσματος φύλλων της μεταχείρισης N<sup>+</sup>/S<sup>+</sup> παρουσία του αναστολέα της κασπάσης 3

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός μελετών που αναδεικνύουν την αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων. Επιπλέον προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου «Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος» έδειξαν ότι εκχυλίσματα ρόκας, που προέρχονται από τις ρίζες και τα φύλλα του φυτού, που αναπτύχθηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες θειούχου και αζωτούχου λίπανσης έχουν διαφορετική σύσταση και συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων και επιδρούν με διαφορετικό τρόπο (συνήθως αναστέλλοντας, αλλά και κάποιες φορές επάγοντας) την ανάπτυξη ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων (Κατσαρού, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα αφορούσαν στην μελέτη εκχυλισμάτων που προέρχονται από φυτά ρόκας που αναπτύσσονται για μικρό χρονικό διάστημα κάτω από διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

Για την παρούσα εργασία καλλιεργήθηκαν φυτά ρόκας υπό διαφορετικές συνθήκες θειούχου και αζωτούχου λίπανσης για μεγάλο χρονικό διάστημα (45 ημέρες) και δημιουργήθηκαν φυτά μεγάλου μεγέθους, από τα οποία απομονώθηκαν φύλλα και ρίζες και δημιουργήθηκαν διαφορετικά εκχυλίσματα. Η λίπανση επιδρά στη σύσταση των εκχυλισμάτων (ολική συγκέντρωση και περιεχόμενο σε μεμονωμένα γλυκοσινολικά) στα διαφορετικά μέρη του φυτού (φύλλα και ρίζες) με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με προηγούμενες μελέτες (Κατσαρού, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), πιθανώς λόγω των διαφορετικών χρόνων καλλιέργειας των φυτών που εφαρμόστηκαν. Βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα της παρούσας μελέτης επιδρούν σε διαφορετικό βαθμό στην ανάπτυξη των διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa, HepG2, MCF-7 και MDA-MB-231. Τα περισσότερα εκχυλίσματα ήταν πολύ δραστικά, σε όλες τις κυτταρικές σειρές σε συμφωνία με τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Fahey et al., 1997, Michael et al., 2011, Khoobhandani et al., 2011, Melchini et al., 2009, Lamy et al., 2008). Αντιθέτως, ταυτοποιήθηκαν και εκχυλίσματα, όπως αυτό των φύλλων της μεταχείρισης  $N^-/S^-$  και των ριζών της μεταχείρισης  $N^+/S^+$  που δεν εμφάνισαν σημαντική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη. Η διαφορά στη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων πιθανώς σε κάποιο βαθμό να αντικατοπτρίζει τις διαφορές στο περιεχόμενο (συγκέντρωση και σύσταση) των ιστών σε γλυκοσινολικά οξέα και στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν ότι, παρουσία του αναστολέα της κασπάσης 3, η κυτταροτοξική δράση του πιο δραστικού εκχυλίσματος (αυτό των φύλλων της μεταχείρισης  $N^+/S^+$ ) μειώνεται σε

σημαντικό βαθμό, υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα επάγει τον μηχανισμό της απόπτωσης σε κύτταρα HeLa. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που αφορούν την αντικαρκινική δράση των γλυκοσινολικών οξέων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M. W., and Weinberg, R.A. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400,464-468,(1999)
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14, 4240–4248.(1995)
- Bryan,T.M., and Cech,T.R Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*11, 318-324. (1999).
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis., 407, 249-257,(2000.)
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider,C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S.Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*11,1921-1929.(1992)
- Shay,J.W., and Bacchetti,S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur.J.Cancer* 33,787-791.(1997)
- Cooper GM . "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle". *The cell: a molecular approach* (2nd ed.). Washington, D.C: ASM Press. ISBN 0-87893-106-6.(2000).
- Bouck, N., Stellmach,V., and Hsu, S.C. How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.*69, 135-174 (1996)
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70. (2000)
- Hanahan, D., and Folkman, J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.(1996)
- Folkman, J. Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 181–204.(1997).
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 94:715-25, (1998).
- Sporn, M.B. The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.(1996)
- Sporn Michael B. and Suh Nanjo (2000) Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* Vol.21, No 3 pp.525-530
- Tsao Anne S., MD; Kim Edward S., MD; Hong Waun Ki, MD (2004) Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* 54: 150-180



- Parsa N. (2012) Environmental factors Inducing Human Cancers. Iranian J Publ Health Vol.41, No 11, p.p 1-9
- Higgison J. Muir CS (1977) Determination of the importance of environmental factors in human cancer: the role of epidemiology. Bulletin du cancer, 64 (3):365-384
- Doll R., Peto R. The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today (1981). Journal of the National Cancer Institute, 66(6):1191-1308
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) Cancer Res, 45: 1-8
- Greenwald P, Kelloff G, Burch Whitman C, Kramer BS: Chemoprevention (1995) CA Cancer J Clin, 45: 31-49
- 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
- Hartman PE, Shankel DM: Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules (1990) Environ Mol Mutagen, 15: 145-182
- 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) Carcinogenesis, 5: 309-314
- Shenoy NR, Choughuley ASU: Inhibitory effect of diet related sulfhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines (1992) Cancer Lett, 65: 227-232
- Pegg AE: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy (1988) Cancer Res, 48: 759-774
- Slaga TJ: Overview of tumor promotion in animals (1983) Environ Health Perspect, 50: 3-14
- Thompson HJ, Ronan AM: Inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary tumorigenesis by a-difluoromethylornithine and retinyl acetate (1983) Proc Am Assoc Cancer Res, 24: 86
- 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
- Huang FL, Roop DR, De Luca LM: Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea (1986) In Vitro Cell Dev Biol, 22:223

- Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub M-P: Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin (1990) *Arch Biochem Biophys*, 283: 107-113
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC: Inhibition of chemical carcinogenesis. In *Chemical induction of Cancer: Modulation and Combination Effects* (Arcos J, Argus M, Woo Y, eds) Boston: Birkhauser Boston, 1997
- Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor  $\beta$  (1988) *Adv Cancer Res*, 51: 107-145
- Jordan VC: The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer (1992) *Cancer*, 70: 977-982
- Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN: Anti-carcinogenic activity of D-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA induced rat mammalian carcinogenesis (1988) *Carcinogenesis*, 9: 331-332
- Lowenstein WR: Junctional intercellular communication and the control of growth (1979) *Biochem Biophys Acta*, 560: 1-65
- 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
- Hill DL, Grubbs CJ: Retinoids and cancer prevention (1992) *Annu Rev Nutr*, 12: 161-181
- Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis (1992) *Cancer Metastasis Rev*, 11: 141-148
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R: Cell death by apoptosis and its protective role against disease (1992) *Trends Pharmacol Sci*, 13: 245-251
- Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Trouset M, Attali P: Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis (1991) *Gastroenterology*, 101: 635-639
- Wainfain E, Poirier A: Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) *Cancer Res*, 52: 2071-2077
- Wainfain E, Dizik M: Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver t-RNA methyltransferase activities in carcinogen treated rats (1987) *Carcinogenesis*, 8: 615-617
- Troll W, Kennedy AR: Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents (1988) *Cancer Res*, 49: 499-502

- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G: Dose related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a non steroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development (1987) *Cancer Res*, 47: 5340-5346
- 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
- Kelloff Gary j., Crowell James., Steele Vernon E., Lubet Ronald A., Malone Winfred A., Boone Charles W., Kopelovich Levy, Hawk Ernest t., Lieberman Ronald, Lawrence Julia A., Ali Iqbal, Viner Jaye L. and Sigman Caroline C. (2000) *Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. J. Nutr.* 130: 467S-471S
- Wang Chong-Zhi, Calwaya Tyler and Yuan Chun-Su (2012) *Herbal Medicines as Adjuvants for Cancer Therapeutics. Am J Chin Med.*, 40(4):657-669
- Brenner DE and Gescher AJ (2005) *Cancer chemopreventive: lessons learned and future directions. British Journal of Cancer*, 93, 735-739
- Perry LM, Metzger (1978) *Medicinal Plants of SE Asia: Attributed Properties and Uses*, The MIT Press: Cambridge, London, UK; Massachusetts, USA, pp. 23-24
- Yaniv Z, Schafferman D, Amar Z (1998) *Tradition, uses and biodiversity of rocket (Eruca sativa, Brassicaceae) in Israel, Econ.Bot.*, 52: 394-400
- Uphof JCT (1968) *Dictionary of Economic Plants*. Verlag Von J. Cramer Publ.: New York, NY, USA
- Varga, J.; Apahidean, A. S.; Lujerdean, A. and Bunea, A. (2009) *Study of some agrotechnological characteristics of rocket (Eruca sativa Mill). Bulletin USAVM Horticulture*, 66(1):472-474
- Heimler D<sup>1</sup>, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. (2007) *Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads.*, *J Agric Food Chem.*, 55:1724-1729
- Martínez-Sánchez A<sup>1</sup>, Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F. (2008) *A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf brassicaceae species.*, *J Agric Food Chem.*, 56:2330-2340
- Antonietta Melchini and Maria H. Traka (2010) *Biological Profile of Erucin: A New Promising Anticancer Agent from Cruciferous Vegetables.*, *Toxins* ,593-612

- Sarwar Alam M<sup>1</sup>, Kaur G, Jabbar Z, Javed K, Athar M.(2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity *Food Chem Toxicol.*45:910-20
- Alqasoumi S1, Al-Sohaibani M, Al-Howiriny T, Al-Yahya M, Rafatullah S. (2009) Rocket "*Eruca sativa*": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity.*World J Gastroenterol.* 15(16):1958-65.
- Gulfraz Muhammad, Saliq Alia, Tariq Hira, Imran Muhammad, Qureshi Rahmatullah and Zeenat Asyia (2011) Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1351-1359
- Khoobehandani M, Ojeswi B. K., Ganesh N, Srivastava M, Gabbanini S, Matera R, Lori R. and Valgimigli L. (2010) Antimicrobial properties and analytical profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extract. *Food Chem.*,120 (1): 217-224.
- Yehuda H1, Khatib S, Sussan I, Musa R, Vaya J, Tamir S(2009) Potential skin anti-inflammatory effects of 4-methylthiobutyl isothiocyanate (MTBI) isolated from rocket (*Eruca sativa*) seeds *Biofactors.* 35(3):295-305
- El-Missiry, M.A.; El Gindy, A.M. Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann. Nutr. Metab.* 2000, 44, 97–100.
- Michael Helana Naguib, Shafik Reham Ezzat, Razmy George Emad (2011) Studies on the chemical constituents of fresh leaf of *Eruca sativa* extract and its biological activity as anticancer agent in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research Vol.* 5(7), pp.1184-1191
- Lamy, E.; Schroder, J.; Paulus, S.; Brenk, P.; Stahl, T.; Mersch-Sundermann, V. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 2415–2421.
- Gadamer, J. 1897. Uber das Sinigrin. *Berichte Deutschen ChemischenGessellschaft* 30:2322-2327.
- Marsh, R.E., and J. Waser. 1970. Refinement of the crystal structure of sinigrin. *Acta /Crystallographica Section B* 26:1030-1037
- Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51
- Jin, J.; Koroleva, O.A.; Gibson, T.; Swanston, J.; Magan, J.; Zhang, Y.; Rowland, I.R.; Wagstaff, C. Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*)

- leafy salad following cultivation in different environments. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 5227–5234.
- Wittstock, U., and B.A. Halkier. 2002. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 7:263-270
  - Textor, S., S. Bartram, J. Kroymann, K.L. Falk, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 218:1026-1035
  - Charron, C.S., A.M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:671-681.
  - Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, D.R. Eagling, R.R. Premier, and P.W.J. Taylor. 2004. The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2632-2639.
  - Rosa, E.A.S., R.K. Heaney, C.A.M. Portas, and G.R. Fenwick. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica* crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
  - Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sørensen, and H. Sørensen. 2007. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae* 114:234-242
  - Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.
  - Price, A.J., C.S. Charron, A. M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of *Brassica juncea* tissue in different soil conditions. *Hortscience* 40:1734-1739
  - Vallejo, F., F.A. Tomas-Barberan, A.G. Benavente-Garcia, and C. Garcia-Viguera. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:307-313
  - Clossaisbesnard, N., and F. Larher. 1991. Physiological-Role of Glucosinolates in *Brassica-Napus*- Concentration and Distribution Pattern of

- Glucosinolates among Plant Organs During a Complete Life-Cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56:25-38.
- Fahey, J.W., Y.S. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10367-10372.
  - Brudenell, A., H. Griffiths, J. Rossiter, and D. Baker. 1999. The phloem mobility of glucosinolates. *J Exp Bot.* 50:745-756
  - Shattuck, V.I., Y. Kakuda, B.J. Shelp, and N. Kakuda. 1991. Chemical-Composition of Turnip Roots Stored or Intermittently Grown at Low-Temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:818-822
  - Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho, and A. Aires. 2002. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6239-6244
  - Jensen, C.R., V.O. Mogensen, G. Mortensen, J.K. Fieldsend, G.F.J. Milford, M.N. Andersen, and J.H. Thage. 1996. Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brassica napus*L) affected by soil drying and evaporative demand. *Field Crops Research* 47:93-105
  - Mailer, R.J., and P.S. Cornish. 1987. Effects of Water-Stress on Glucosinolate and Oil Concentrations in the Seeds of Rape (*Brassica napus* L) and Turnip Rape (*Brassica rapa* L *Varsilvestris* [Lam] Briggs). *Australian Journal of Experimental Agriculture* 27:707-711
  - Li, S.M., I. Schonhof, A. Krumbein, L. Li, H. Stutzel, and M. Schreiner. 2007. Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa* ssp *rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8452-8457
  - Kopsell, D.A., T.C. Barickman, C.E. Sams, and J.S. McElroy. 2007. Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10628-10634
  - Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Muller, and A. Krumbein. 2007. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 170:6572

- Zhao, F.J., E.J. Evans, P.E. Bilsborrow, and J.K. Syers. 1993. Influence of sulfur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63:29-37
- Josefsson, E. 1970. Glucosinolate content and amino acid composition of rapeseed (*Brassica napus*) meal as affected by sulphur and nitrogen nutrition, pp. 98-103, Vol. 21.
- Falk, K.L., C. Vogel, S. Textor, S. Bartram, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* 65:1073-1084.
- Grubb, C.D., and S. Abel. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11:89-100.
- Chen, X.-j., Z.-j. Zhu, X.-l. Ni, and Q.-q. Qian. 2006. Effect of Nitrogen and Sulfur Supply on Glucosinolates in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Agricultural Sciences in China* 5:603-608
- Omirou, M., I. Papastylianou, R. Iori, C. Papastephanou, K.K. Papadopoulou, C. Ehaliotis, and D.G. Karpouzas. 2009. Microwave-assisted Extraction of Glucosinolates from *Eruca sativa* Seeds and Soil: Comparison with Existing Methods. *Phytochemical Analysis* 20:214-220.
- Noret, N., P. Meerts, R. Tolra, C. Poschenrieder, J. Barcelo, and J. Escarre. 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *New Phytologist* 165:763-772
- Siemens, D.H., and T. MitchellOlds. 1996. Glucosinolates and herbivory by specialists (Coleoptera: Chrysomelidae, Lepidoptera: Plutellidae): Consequences of concentration and induced resistance. *Environmental Entomology* 25:1344-1353
- Agrawal, A.A., and N.S. Kurashige. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 29:1403-1415
- Burow, M., R. Muller, J. Gershenzon, and U. Wittstock. 2006. Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 32:2333-2349
- Khoobchandani M, Ganesh N, Gabbanini S, Valgimigli L, Srivastava MM. 2011, Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth. *Fitoterapia*. 647-53

- Mahdy S.S. (2012) The Antigenotoxicity of *Eruca sativa* Mill Extract on Bone marrow Cells of Male Albino Mice Treated With Vincristine. *Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science*, Vol.25, No 2
- Drewnowski A<sup>1</sup>, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr.*2000 Dec;72(6):1424-35.
- Endreva A., Velikova V., Tsonev T., Dagnon S., Gurel A., Aktas L., Gesheva E (2008) Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiology*, special issue 34 (1-2), 67-78
- Hadacek F., (2002) Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future prospective. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21, 273-322
- Wittstock U, Burow M 2010..Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book.* ;8:e0134
- Gerendás J<sup>1</sup>, Breuning S, Stahl T, Mersch-Sundermann V, Mühling KH, (2008) Isothiocyanate concentration in Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) plants as influenced by sulfur and nitrogen supply. *J Agric Food Chem*56(18):8334-42
- Mithen R. (2001) Glycosinolates-biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regul.* 34, 91-103
- Juge N<sup>1</sup>, Mithen RF, Traka M. (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64(9):1105-27.
- Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem.* 2001;276(34):32008-32015f
- Cornelis MC<sup>1</sup>, El-Sohemy A, Campos H (2007) GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr.*86(3):752-8.
- Mersch-Sundermann, V.; Knasmüller, S.; Wu, X. J.; Darroudi, F.; Kassie, F. (2004). "Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents". *Toxicology.* 198 (1–3): 329–340.
- Van IJzendoorn SC, Zegers MM, Kok JW, Hoekstra D.J *Cell Biol.* 1997 Apr 21;137(2):347-57.
- Glodek, Cass, Ph.D., "A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement," 1990, page 68, Michigan Cancer Foundation, Detroit.



- Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*. **51** (5): 1409–1416.
- Levenson, AS; Jordan VC. (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". *Cancer Research*. **57** (15): 3071–3078.
- Curtin J. and Cotter T., Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cellular Signalling*, 2003, 15, 983-992
- Krauss G., *Biochemistry of Signal transduction and Regulation*, Chapter 15: Apoptosis, Wiley Editions, 2002
- Zhivotovsky B., and Orrenius S., Caspase-2 function in response to DNA damage, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 2005, 331, 859-867
- Wu X, Zhou QH, Xu K Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacol Sin.* 30(5):501-12. (2009)
- *Plant Physiology*, Taiz & Zeiger, 2010, Εκδόσεις Utopia