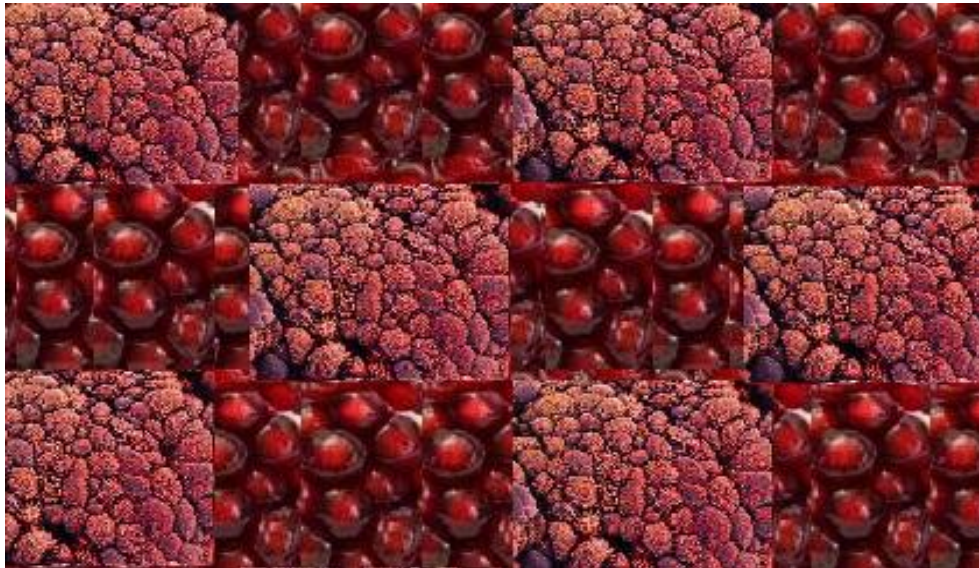




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ  
ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

## «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ»



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΘΑ-ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ ΚΑΤΣΑΡΟΥ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΥΛΙΚΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Επιβλέπουσα

Θ. Θεοφανίδης, Ομ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Κ. Ξένος, Δρ. Βιοχημικός

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Θ. Θεοφανίδης, Ομ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Δ. Υφαντής, Καθηγητής ΕΜΠ

Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Γ. Μπατής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Α. Κατσαρού, Αν. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Σ. Μαρκαντώνη- Κυρούδη Αν. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Η διατριβή εγκρίθηκε την 8<sup>η</sup> Νοεμβρίου 2012

Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, αρ.202).

Στον ένα και μοναδικό!  
Στον μπαμπάκα μου, που είναι στον ουρανό!

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας την εκπόνηση της διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν να πραγματοποιήσω αυτή μου την προσπάθεια. Πρώτα από όλους ευχαριστώ θερμά την καθηγήτριά μου κα Αναστασοπούλου Ιωάννα, όχι μόνο για την επιστημονική υποστήριξη και ουσιαστική καθοδήγηση, αλλά και για το αμείωτο ενδιαφέρον καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, στον Δρ. Ξένο Κυριάκο, ο οποίος συνέβαλε σημαντικά στην επιλογή του θέματος, την οριστικοποίηση της ιδέας και μέχρι το τέλος ήταν δίπλα μου επιστημονικά και ηθικά. Σίγουρα χωρίς αυτόν, δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί σε κανένα επίπεδο η εξειδικευμένη αυτή έρευνα. Ευχαριστώ επίσης τον κο ομ. Καθ. Θεοφανίδη Θεόφιλο, για την επιστημονική επιμέλεια της εργασίας μου και την προσφορά της ανεκτίμητης γνώσης του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κο Νεκτάριο Αληγιάννη, την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Σοφία Μαρκαντώνη-Κυρούδη, την Δρ. Χρисиίδα Τσιμπούλη, την Δρ. Ντραγκάνα Νικίτοβιτς τη Δρ. Σηφάκη Μαρία και τον Δρ. Παναγιώτη Πολυχρονόπουλο για την επιστημονική και τεχνική βοήθεια που μου παρείχαν. Τις Δρ. Β. Δρίτσα και Δρ. Κ. Πισσαρίδη για την ευρύτερη συνεργασία κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της διατριβής Η βοήθεια όλων ήταν ουσιαστική και πολύτιμη.

Δε μπορώ να ξεχάσω τον κοΔ. Υφαντή Καθηγητή ΕΜΠ, την κα Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π, τον κο Γ. Μπατή, Καθηγητής Ε.Μ.Π. και την κα Α. Κατσαρού, Αν. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ, που μου έκαναν την τιμή να λάβουν μέρος στην επταμελή επιτροπή μου. Πριν το τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον π.Χρυσόστομο Ταβουλαρέα που τόσα χρόνια, με την προσευχή του και την αγάπη του, μου δίνει δύναμη σε κάθε μου βήμα.

Φυσικά, τον πατέρα μου Γεώργιο Κατσαρό, τη μητέρα μου Άννα Κακουλάκη και τον αδερφό μου Ιωάννη Κατσαρό, που στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και που χωρίς εκείνους τίποτα δε θα ήταν εφικτό. Με έμαθαν να ονειρεύομαι και να προσπαθώ.

Φθάνοντας στο τέλος της διατριβής έφυγε από κοντά μας ο λατρεμένος μου πατέρας Γεώργιος Κατσαρός, στον οποίο στέλνω το μεγαλύτερο ευχαριστώ για το μάθημα ζωής που μου έδωσε τόσο απλόχερα και ελπίζω να με βλέπει από ψηλά και να χαμογελά ευχαριστημένος!

**Ευχαριστώ ειλικρινά.**

## I. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>9</b>
<b>PREFACE</b> .....	<b>10</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α</b> .....	<b>15</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>15</b>
1. ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....	15
1.1 Επιδημιολογία .....	16
1.2. Αίτια και παράγοντες κινδύνου.....	16
1.3 Παθολογία και βιολογία .....	17
1.4 Κλινικές μορφές.....	19
1.5 Διάγνωση .....	20
1.6. Σταδιοποίηση .....	20
1.7 Πρόγνωση .....	21
1.8 Θεραπεία.....	22
Χημειοπροστασία.....	22
3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	24
3.1. Φλαβονοειδή και συγγενείς ομάδες <sup>42-46</sup> .....	25
3.2 Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών:.....	27
3.3 Μέθοδος απομόνωσης.....	27
3.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες.....	27
4. ΤΟ ΡΟΔΙ.....	29
4.1 Εισαγωγή και ιστορικές αναφορές .....	29
4.2 Περιγραφή του φυτού.....	30
4.3. Δραστικά συστατικά του ροδιού.....	31
4.4. Θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού.....	34
5. P38 MAPK ΚΙΝΑΣΕΣ .....	36
5.1 Γενικά .....	36
5.2 Ο διπλός ρόλος της p38 MAPK στον κυτταρικό θάνατο .....	37
5.3 Ο ρόλος της p38α στον καρκίνο και τη θεραπεία του.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β</b> .....	<b>39</b>
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>39</b>
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
6.1 Υλικά .....	39

6.2. Αντιδραστήρια .....	39
6.2.β Αντιδραστήρια για την ανίχνευση της p38 στις κυτταρικές σειρές .....	40
<b>7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ- ΡΗΤΙΝΕΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ.....</b>	<b>42</b>
7.1 Προσρόφηση.....	42
7.2 Μηχανισμός προσρόφησης.....	42
7.3 Ρητίνες προσρόφησης.....	43
7.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ρητινών XAD-4, XAD-16, XAD-7HP .....	44
7.5 Χημική δομή ρητινών XAD-4, XAD-16 και XAD-7HP.....	45
7.6 Τεχνικές χρήσης ρητινών προσρόφησης .....	46
7.7 Προετοιμασία ρητινών .....	47
7.8 Πείραμα προσρόφησης με τεχνική στήλης.....	47
<b>8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ p38 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....</b>	<b>48</b>
8.1 Διαδικασία ανίχνευσης .....	48
8.2 Διαδικασία εξαγωγής πρωτεϊνών από τα κύτταρα.....	49
8.3 Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	50
<b>9.ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ .....</b>	<b>51</b>
9.1. <i>Invitro</i> cell lines screening project/ (Υπολογισμός ανάπτυξης των κυττάρων sbcl1) .....	51
9.2 Υπολογισμός αριθμητικής ανάπτυξης των κυττάρων A375 και M5 .....	53
<b>10. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p38α.....</b>	<b>53</b>
10.1 Διαδικασία μεθόδου .....	55
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.....</b>	<b>56</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>56</b>
11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ -Επιλογή ρητίνης.....	56
12. Sbc11 ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ.....	57
12.1 Επίδραση των πολυφαινολών στην κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1.....	57
12.2 Αποτελέσματα δράσης του σαλικυλικού νατρίου στην κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1.....	61
12.3 Η επίδραση θεοφυλλίνης στα Sbc11 .....	66
12.4 Σύγκριση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού ως προς τις υπόλοιπες ουσίες.....	68
12.5 Συγχορήγηση 20mm σαλικυλικού νατρίου με πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού και με θεοφυλλίνη.....	69
12.6 Αποτελέσματα έκλυσης της φωσφορυλιωμένης p38 MAP κινάσης στα κύτταρα sbcl1 .....	71
<b>13. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ</b>	

ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ M5 ΚΑΙ A375. ....	73
13.1 Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς M5, παρουσία πολυφαινολών. ....	75
13.2 Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς A375, παρουσία πολυφαινολών. ....	77
13.3 Ανάπτυξη κυττάρων A375 και M5, παρουσία πολυφαινολών (σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς). ....	79
13.4 Αναστολή % της ανάπτυξης των κυττάρων M5 και A375 παρουσία πολυφαινολών. ....	82
13.5 Σύγκριση πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού και ολικού εκχυλίσματος ροδιού. ....	86
14. ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ p38α ΜΑΡ ΚΙΝΑΣΗΣ. ....	93
14.1 Δράση του πολυφαινολικού διαλύματος και της δελφινιδίνης στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α. ....	97
14.2 Δράση του σαλικυλικού νατρίου στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α. ....	99
14.3 Δράση άλλων ουσιών στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α ΜΑΡ κινάση. ....	100
14.4 Δράση της θεοφυλλίνης στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α. ....	103
14.5 Σύγκριση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος με τις υπόλοιπες ουσίες σε σχέση με την επίδρασή τους στην p38α κινάση. ....	104
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ. ....	107
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ. ....</b>	<b>110</b>



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Για το λόγο αυτό, είναι στο επίκεντρο των περισσότερων ερευνών ανά τον κόσμο. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος οι σύγχρονες έρευνες εστιάζουν στη μελέτη τρόπων είτε παρεμπόδισης είτε χημειοπροστασίας από την καρκινογένεση. Χημειοπροστασία ονομάζουμε τη χρήση ουσιών που αναστέλλουν ολικά ή μερικώς την καρκινογένεση. Στα πλαίσια της χημειοπροστασίας του καρκίνου έχουν μελετηθεί πολλές σύνθετες ή φυσικές χημικές ενώσεις. Πλέον όμως σήμερα, η έρευνα στρέφεται ιδιαίτερα στη μελέτη φυτοχημικών παραγόντων, ουσιών δηλαδή που περιέχονται στα φυτά και τα βότανα. Μεταξύ αυτών των συστατικών ξεχωρίζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις, όπως οι ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή, οι ισοφλαβόνες και τα φαινολικά οξέα.

Ο καρκίνος του δέρματος και ιδιαίτερα το μελάνωμα, είναι από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου. Μεγάλος αριθμός μελετών συνδέει άμεσα την ανάπτυξη μελανώματος με εκτεταμένη έκθεση των ατόμων στην ηλιακή ακτινοβολία. Υπάρχουν επίσης μελέτες στις οποίες αναφέρεται, ότι το εκχύλισμα ροδιού είναι ένα φυσικό προϊόν που προστατεύει τον άνθρωπο έναντι στη UV ακτινοβολία. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το ρόδι είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιδιώκεται η λήψη ειδικά επεξεργασμένου πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού και η μελέτη του μηχανισμού της επίδρασης αυτού στην ανάπτυξη διαφόρων κυτταρικών σειρών μελανώματος, όπως A375, M5 και sbcl1. Παράλληλα και για καλύτερη προσέγγιση στον μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών ροδιού μελετάται στις ίδιες σειρές η δράση του σαλικυλικού νατρίου, της θεοφυλλίνης, του ακετυλοσαλικυλικού οξέος, του καφεϊκού οξέος και της δελφινιδίνης, ενώσεις δηλαδή που αποδεδειγμένα προκαλούν κατασταλτική δράση στην ανάπτυξη του καρκίνου σε σχέση με την MAP κινάση p38, την πρωτεΐνη κλειδί στο μονοπάτι της απόπτωσης.

## PREFACE

Cancer is one of the most significant causes of death in developed countries, with high morbidity rates. For this reason most researchers all over the world are focused on this problem. To address the problem, most of the researchers working on this field are focused on the study of new ways of prevention or for chemoprophylaxis against carcinogenesis.

The use of substances that totally or partially inhibit carcinogenesis is defined as chemoprophylaxis. Many chemical substances are studied in the context of cancer chemoprophylaxis, but now research has turned particularly towards the study of phytochemical compounds derived from plants and herbs. Among these substances flavonoids, isoflavones and phenolic acids are discrete. Skin cancer and more specifically melanoma, is one of the most aggressive forms of cancer. Melanoma has been directly related to prolonged exposure to the sun. In previous studies it is proved that pomegranate extract is a natural protective agent against UV radiation. Furthermore, pomegranate is known to be rich in polyphenols.

In the present thesis our primary objective was the investigation into the effect of specially processed pomegranate extract rich in polyphenols, on the mechanism of development of various melanoma cell lines (A375, M5 and sbcl1). In parallel, for comparison, additional substances with a proven sedative effect on cancer development, will be used to study the effect on MAP kinase p38, which is an important key-protein of the MAP kinases pathway and apoptosis.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή, μελετάται η επίδραση των πολυφαινολικών ενώσεων στην ανάπτυξη των sbcl1, M5 και A375 κυτταρικών σειρών μελανώματος. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι συστατικά του ροδιού, τα οποία παραλήφθηκαν με ειδική επεξεργασία του εκχυλίσματος χυμού.

Η απομόνωση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος από το χυμό του ροδιού έγινε με τη μέθοδο των ρητινών προσρόφησης. Η μελέτη, ο χαρακτηρισμός καταλληλότητας και η επιλογή των ρητινών στηρίχθηκαν στην θεωρία Freudlich και την ομόνυμη εξίσωση.

Μετά την επιλογή των ρητινών και την παραλαβή του πολυφαινολικού εκχυλίσματος έγιναν πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος, στα sbcl1 κύτταρα μελανώματος. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα, που λήφθηκαν με σαλικυλικό νάτριο και θεοφυλλίνη για την ίδια κυτταρική σειρά μελανωμάτων sbcl1. Οι δύο αυτοί παράγοντες επιλέχθηκαν γιατί από τη βιβλιογραφία προτείνονται ως αποπτωτικοί. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση του εκχυλίσματος σε πιο κλασικές σειρές μελανώματος, όπως είναι οι A375 και M5.

Επί πλέον στις σειρές μελανώματος A375 και M5 χρησιμοποιήθηκε και ο ολικός χυμός ροδιού, έτσι ώστε να φανεί αν υπάρχουν διαφορές στην ανταπόκριση των κυττάρων μεταξύ εκχυλίσματος και χυμού. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων έδειξαν ότι, η δραστηριότητα του εκχυλίσματος στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπερέχει σημαντικά της θεοφυλλίνης και του χυμού ροδιού. Από τη σύγκριση προκύπτει ότι το εκχύλισμα αγγίζει τα ίδια επίπεδα απόδοσης με αυτή του σαλικυλικού νατρίου.

Στη συνέχεια, προκειμένου να προσδιορισθεί ο μηχανισμός αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, που προκαλείται από τις πολυφαινόλες, ερευνήθηκε η επίδραση των πολυφαινολών του εκχυλίσματος στην πρωτεΐνη p38α. Για την ορθή απόδοση τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα που προκλήθηκαν από το σαλικυλικό νάτριο, το ακετυλοσαλικυλικό νάτριο, τη θεοφυλλίνη, το καφεϊκό οξύ, τη δελφινιδίνη και τον εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου SB202190.

Από τα αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην αναστολή της p38α όχι μόνο σε σχέση με όλες τις χρησιμοποιηθείσες ουσίες, αλλά και ως προς τον εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου SB202190.

Από τα πειραματικά δεδομένα συμπεραίνεται ότι οι πολυφαινόλες φαίνεται να δρουν αφενός άμεσα με το ένζυμο και αφετέρου έμεσα μέσα από μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Τέλος οι πολυφαινόλες εμφανίζουν τη διπλή ιδιότητα να προστατεύουν τα υγιή κύτταρα, ενώ καταστρέφουν τα κύτταρα του μελανώματος. Η προστασία από τις πολυφαινόλες επιτυγχάνεται είτε με δέσμευση των ελευθέρων ριζών είτε με επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν προκαλέσει οι ελεύθερες ρίζες σε βασικά βιολογικά μόρια, όπως π.χ. το DNA. Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων του μελανώματος αποδίδεται στη σύνδεση των πολυφαινολών είτε άμεσα με ιοντικό δεσμό είτε με δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων νερού, οδηγώντας έτσι σε απενεργοποίηση της p38α κινάσης.

## ABSTRACT

In the present thesis, the effect of polyphenolic compounds on the development of sbcl1, M5 and A375 melanoma cell lines is studied. The polyphenolic compounds are ingredients of pomegranate and are derived with specific processing during extraction.

The isolation of polyphenolic extract from pomegranate juice was performed using the adsorption resin method. The study, suitability characterization and selection of resins were based on, the Freudlich theory and the homonymous equation.

After the isolation of the resins, the polyphenolic extracted components were used to study the effect of polyphenolic extract on sbcl1 melanoma cells. The results were compared with those of sodium salicylate and theophylline for the same melanoma cell line sbcl1, known from the literature to have apoptotic properties. Moreover, we studied the effect of the polyphenolic extracted components on well known classical melanoma cell lines, such as A375 and M5.

Furthermore, pomegranate juice was used to investigate its effect on A375 and M5 melanoma cell lines for comparison with extracted components. The comparison of the results showed that the effectiveness of extracted components on cell proliferation inhibition was significantly superior to that of theophylline and pomegranate chyme, indicating that extracted components reached the effectiveness of sodium salicylate.

Finally, in order to determine the cell proliferation inhibition mechanism of the polyphenolic compounds, we investigated the effect of polyphenolic compounds of the extract on p38 $\alpha$ . For correct interpretation we compared our results with those obtained with sodium salicylate, sodium acetylsalicylate, theophylline, caffeic acid, delphinidine and the SB202190 enzyme selective inhibitor. With these experiments we proved that polyphenolic extract is the most effective inhibitor of p38 $\alpha$ , compared with all the above mentioned compounds, more effective even than the SB202190 enzyme selective inhibitor.

From the experimental data it was concluded that polyphenolic compounds react directly with the enzyme and indirectly via free radical mechanism. Furthermore, it was shown that polyphenolic compounds protect

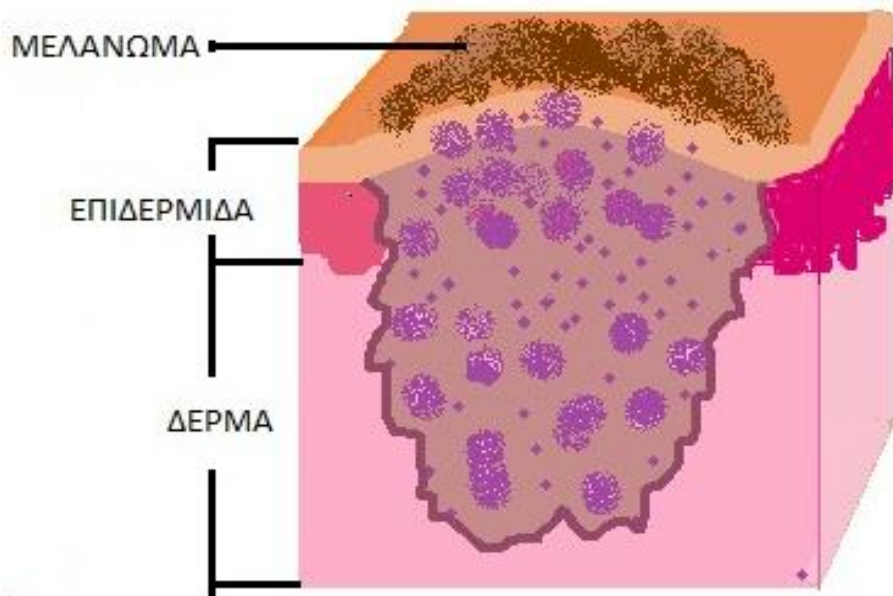
healthy cells and destroy melanoma cells. The polyphenolic compounds protect healthy cells through scavenging of free radicals, thus inhibiting their reaction with important biological molecules, such as DNA. The anticancer activity of polyphenolic compounds is a result of adhesion to cell membranes and inactivation of p38 $\alpha$  kinase reacting with the ATP moiety.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Το μελάνωμα είναι ένας θανατηφόρος όγκοστος δέρματος με συνεχώς αυξανόμενη πορεία και δημιουργείται από την κακοήθη εξαλλαγή των μελανοκυττάρων<sup>1,2</sup>. Τα μελανοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μελανίνης. Κατά την εμβρυϊκή ζωή, πρόδρομα κύτταρα γνωστά ως μελανοβλάστες, μεταναστεύουν στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας και λιγότερο συχνά στο χόριο και στους σμηγματογόνους αδένες. Το μελάνωμα προέρχεται από μελανοκύτταρα που βρίσκονται σε αυτές τις θέσεις και από μετασχηματισμένα μελανοκύτταρα, τα σπιλοκύτταρα σε πρόδρομες βλάβες του μελανώματος<sup>3</sup>.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση μελανώματος.

## 1.1 Επιδημιολογία

Η εμφάνιση δερματικού μελανώματος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα ανέρχεται σε ποσοστά 1% και 1.8% για τους άνδρες και τις γυναίκες, αντίστοιχα. Συνολικά καταγράφονται κάθε χρόνο στην Ευρώπη 17.000 νέα διαγνωσμένα περιστατικά και 5.000 θάνατοι από μελάνωμα. Η εμφάνιση του μελανώματος αυξάνει σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Το μελάνωμα συνεχίζει να εμφανίζει γρηγορότερη από κάθε άλλο καρκίνο με συχνότητα 3-7% κάθε χρόνο<sup>4</sup>.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται παγκοσμίως ραγδαία αύξηση των νέων διαγνωσμένων μελανωμάτων σε επίπεδα 3 έως 8 % ανά έτος. Αναφέρεται ότι στην Αγγλία ο κίνδυνος εμφάνισης στη διάρκεια της ζωής διηθητικού μελανώματος ήταν 1:1500 το 1935, 1:600 το 1960, έφθασε το 2000 το ποσοστό 1:75 και υπολογίζεται<sup>5</sup> ότι πρέπει να προσέγγισε το ποσοστό 1:50 το 2010. Στην Αμερική το 2002 αναπτύχθηκε μελάνωμα σε 87.800 Αμερικανούς<sup>6</sup>.

Ο μέσος όρος ηλικίας προσβολής είναι το 45<sup>ο</sup> έτος, μία σχετικά νεαρή ηλικία για ασθενή με καρκίνο. Το μελάνωμα εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια πριν την εφηβεία, ενώ αυξάνει η επίπτωσή του κατά την πέμπτη δεκαετία. Στους έγχρωμους το μελάνωμα είναι σπάνιο και συνήθως εμφανίζεται σε θέσεις με λιγότερη μελανίνη όπως η υπονύχια περιοχή, οι παλάμες στα χέρια και τα πέλματα στα πόδια. Ωστόσο η θνησιμότητα στους έγχρωμους είναι υψηλότερη<sup>4</sup>.

## 1.2. Αίτια και παράγοντες κινδύνου

### 1.2.α Έκθεση στον ήλιο και στην υπεριώδη ακτινοβολία

Ο κίνδυνος του μελανώματος σχετίζεται περισσότερο με την έντονη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και στα εγκαύματα που προκαλεί, παρά με τη συνολική έκθεση στον ήλιο κατά τη διάρκεια της ζωής<sup>7,8</sup>, δηλαδή εξαρτάται από το ρυθμό δόσης της ακτινοβολίας. Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι 19 στις 22 περιπτώσεις σοβαρά ηλιακά εγκαύματα αυξάνουν την επικινδυνότητα εμφάνισης μελανώματος<sup>9,10</sup>.

Στα παραπάνω συμβάλλουν και τα στατιστικά αποτελέσματα που προέκυψαν από συγκριτικές μελέτες ομάδων μεταναστών. Η μετανάστευση πληθυσμού σε νεαρή ηλικία από βόρεια την Ευρώπη σε πιο ηλιόλουστες περιοχές, όπως το Ισραήλ και η Αυστραλία, απέδειξε ότι η έκθεση σε έντονη



ακτινοβολία είναι σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης μελανώματος<sup>11</sup>. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ ομάδων που γεννήθηκαν στο Ισραήλ και στην Αυστραλία και αυτών που κατέφτασαν στις χώρες αυτές μετά την ηλικία των 5 ετών δείχνουν μεγαλύτερη ρυθμό στην εμφάνιση μελανώματος στην πρώτη ομάδα.

### **1.2.β Τεχνητές πηγέςUV**

Αρκετές μελέτες συγκαταλέγουν στους παράγοντες κινδύνου τη χρήση ειδικών υπεριωδών λυχνιών και σολάριουμ για τεχνητό μαύρισμα, δεδομένου ότι έκθεση σε τεχνητή UV ακτινοβολία προκαλεί την ίδια χημική, βιοχημική και βιολογική διέγερση των κυττάρων. Η τεχνητή UV ακτινοβολία σε συνδυασμό με τη φυσική έκθεση στην κοσμική ακτινοβολία συμβάλλουν στηνανάπτυξη μελανώματος<sup>11-15</sup>

### **1.2.γΟρμονικοί παράγοντες**

Η χρήση αντισυλληπτικών στις γυναίκες έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου για το μελάνωμα<sup>16</sup>, αποδίδοντας το αποτέλεσμα σε ορμονικές διαταραχές

### **1.2.δ Επάγγελμα**

Ο κίνδυνος μελανώματος είναι ήπια αυξημένος σε πιλότους και σε άλλα μέλη που εργάζονται σε αερογραμμές. Μελέτη σε 10.032 πιλότους έδειξε ένα πολύ μικρό σχετικό κίνδυνο<sup>17</sup>, που όμως δεν συνδέεται άμεσα με την UV ακτινοβολία, δεδομένου ότι το παράθυρο απορροφά την UV ακτινοβολία.

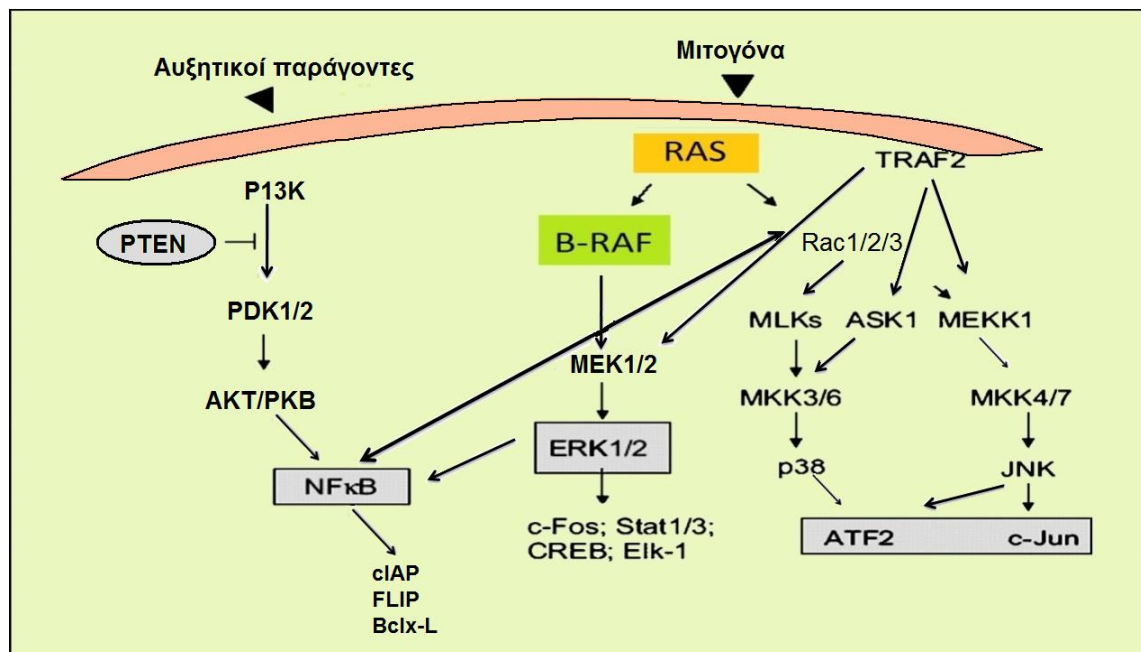
## **1.3 Παθολογία και βιολογία**

Το μελάνωμα είναι ένας κακοήθης όγκος που προέρχεται από το μετασχηματισμό και τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων που φυσιολογικά βρίσκονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Όμως η παθογένεια του μελανώματος φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική και αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας. Το πρωτοπαθές δερματικό μελάνωμα μπορεί να εμφανιστεί είτε πάνω σε μια προϋπάρχουσα βλάβη (δυσπλαστικός σπίλος, συγγενής σπίλος) είτε εξ αρχής πάνω σε φυσιολογικό δέρμα<sup>18</sup>.

Τα κύτταρα του μελανώματος χαρακτηρίζονται από σχετική αυτόνομη ανάπτυξη στις καλλιέργειες. Έτσι θεωρείται ως ένας αυτοκρινής μηχανισμός διέγερσης της ανάπτυξης και που οι λειτουργίες γίνονται μέσω έκκρισης ενδογενών πεπτιδίων-παραγόντων ανάπτυξης όπως ο βFGF, PDGF, TGFα, TGFβ, IL-1<sup>19</sup>.

Κυτταρικά μονοπάτια με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων που σχετίζονται και με το μελάνωμα είναι αυτά της p53, του ρετινοβλαστόματος και των MAP κινασών. Αυτά τα μονοπάτια ενεργοποιούνται από τα BRAF και NRAS ογκογονίδια<sup>20</sup>(Εικόνα 2). Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF είναι οι πιο κοινές στο κακοήθες μελάνωμα και αντιπροσωπεύουν το 50% των μεταλλάξεων. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομικές αλλά μπορεί και επίκτητες ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και έχουν σαν αποτέλεσμα να αποσυντονίζουν τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

Ο όγκος μπορεί να ανατύσσεται σε μονοφασική ή διφασική μορφή<sup>18</sup>. Η διφασική μορφή περιλαμβάνει την οριζόντια ή ακτινωτή αρχική φάση ανάπτυξης (ενδοεπιδερμική), ακολουθούμενη από μεταγενέστερη κάθετη φάση ανάπτυξης, η οποία αντιστοιχεί στη διήθηση του χορίου και της υποδερμίδας. Η κάθετη ανάπτυξη είναι και αυτή που μπορεί να οδηγήσει σε μετάσταση<sup>21</sup>.



**Εικόνα 2.** Σχηματική παράσταση των μοριακών στόχων στο μελάνωμα από την αγγειογένεση στην απόπτωση<sup>20</sup>.

## 1.4 Κλινικές μορφές

Το μελάνωμα εμφανίζει διαφορετικές μορφές ανάπτυξης. Με βάση το ποσοστό εμφάνισης στον πληθυσμό ταξινομείται σε τέσσερις κύριες μορφές και σε άλλους τύπους που θεωρούνται δευτερεύοντες. Στους παρακάτω Πίνακες 1 και 2, φαίνεται η ονομασία και τα ποσοστά εμφάνισης στις κύριες μορφές ανάπτυξης του μελανώματος.

**Πίνακας 1.** Κατηγορίες μελανωμάτων

Ονομασία	Ποσοστά εμφάνισης
Μελάνωμα σε έδαφος κακοήθους φακής του Hutchinson (Lentigomalignamelanoma) LMM.	4-15% επί του συνόλου των κακοήθων μελανωμάτων
Επιφανειακώς αναπτυσσόμενο κακοήθες μελάνωμα (Superficialspreadingmelanoma) SMM .	70%
Οζώδεςμελάνωμα (Nodular melanoma) NM.	(15-30%) επί του συνόλου των κακοήθων μελανωμάτων <sup>22</sup>
Μελάνωματωνάκρων (Acral lentiginous melanoma) ALM	Απαντάται με συχνότητα 40-50% στους μαύρους, ενώ στους λευκούς κατά 5-10% επί του συνόλου των κακοήθων μελανωμάτων <sup>22</sup>

**Πίνακας 2.** Κλινικοί τύποι μελανωμάτων

Κακοήθες μελάνωμα σε έδαφος προϋπάρχοντος μελαχρωματικού σπίλου.
Μελάνωμα των βλεννογόνων
Πολλαπλούν πρωτοπαθές
Κακοήθες μελάνωμα παιδικής ηλικίας
Δεσμοπλαστικό και νευροτροπικό
Αμελανωτικό Κ.Μ.
Πολυποειδές Κ.Μ.
Υποστρέφον Κ.Μ.
Εξ αφροδών κυττάρων
Κακοήθης κυανούς σπίλος

## 1.5 Διάγνωση

Για την ορθή διάγνωση του μελανώματος πολύ βασικό στοιχείο θεωρείται ο χρόνος της δερματικής αλλαγής. Θεωρείται ότι μία δερματική βλάβη είναι μελάνωμα εφόσον η αλλαγή έχει γίνει σε διάστημα μηνών. Μικρότερα χρονικά διαστήματα συνήθως σχετίζονται με φλεγμονώδεις καταστάσεις. Επιπλέον ουσιώδη διαγνωστική αξία έχουν και οι μεταβολές του μεγέθους (αύξηση) και του χρώματος. Αυτά τα κριτήρια είναι αντιπροσωπευτικά στοιχεία σε ποσοστό που αφορά περίπου το 70% των ασθενών<sup>23</sup>. Σε πιο προχωρημένες βλάβες συναντάται και εμφάνιση επάρματος, κνησμού, έλκωσης ή αιμορραγίας<sup>24</sup>. Για τη διάγνωση του μελανώματος χρησιμοποιείται ο κανόνας ABCD<sup>25</sup>, ο οποίος θέτει τέσσερα διαγνωστικά κριτήρια όπως:

- A – ασυμμετρία
- B – όριο
- C – χρώμα
- D – δερματοσκοπική εικόνα.

Η μέθοδος ABCD δεν είναι απόλυτη γιατί μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Με τη βοήθεια όμως της δερματοσκόπησης σε συνδυασμό με τον κανόνα ABCD μπορούν να εντοπιστούν μικρά και χαμηλού κινδύνου μελανώματα.

## 1.6. Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του μελανώματος στηρίζεται πλέον στο πρόσφατο σύστημα TNM, όπως δημοσιεύθηκε από την American Joint Committee on Cancer (AJCC). Η αρχική μελέτη του Balch και συνεργατών<sup>26</sup> επεκτάθηκε με την παρακολούθηση 17.000 ασθενών<sup>2</sup>. Η μεγαλύτερη αλλαγή, όπως χαρακτηρίζεται από το επίπεδο διήθησης κατά Clark, δεν χρησιμοποιείται για τα πρωτοπαθή μελανώματα πάχους μεγαλύτερου του 1mm.

### 1.6.α Η μικροσταδιοποίηση Clark

Η μικροσταδιοποίηση κατά Clark βασίζεται στο βάθος της διήθησης του μελανώματος στο δέρμα<sup>27</sup>.

Τα διάφορα επίπεδα του όγκου περιλαμβάνουν:

Επίπεδο I. *In situ* melanoma –ενδοεπιδερμικό

Επίπεδο II. Αρχόμενη διήθηση του θηλώδους χορίου

Επίπεδο III. Πλήρης διήθηση του θηλώδους χορίου

Επίπεδο IV. Διήθηση δικτυωτού χορίου

Επίπεδο V. Διήθηση υποδόριου λίπους

### 1.6.β Η μικροσταδιοποίηση Breslow

Η μικροσταδιοποίηση κατά Breslow καταγράφει το ακριβές πάχος του όγκου με τη χρήση οπτικού μικρόμετρου<sup>28</sup>. Σε γενικές γραμμές το βάθος κατά Breslow καθορίζει τα όρια της χειρουργικής εκτομής.

### 1.7 Πρόγνωση

Η πρόγνωση του μελανώματος εξαρτάται από το στάδιο της νόσου<sup>2</sup> όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Γενικό σύστημα σταδιοποίησης του μελανώματος (AJCC)

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ
I	Εντοπισμένη νόσος χαμηλού μεταστατικού κινδύνου	95%
II	Εντοπισμένη νόσος ενδιάμεσου μεταστατικού κινδύνου	80-95%
III	Προσβολή επιχώριων λεμφαδένων (υποκλινική ή κλινική) intransit ή δορυφορικές μεταστάσεις	15%
IV	Απομακρυσμένες μεταστάσεις	6 μήνες

## 1.8 Θεραπεία

Η αντιμετώπιση του μελανώματος διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες:

- 1) **Τη θεραπεία του πρωτοπαθούς όγκου**, η οποία γίνεται με σωστή χειρουργική αφαίρεση, εκλεκτική λεμφαδενεκτομή και βιοψία του λεμφαδένα φρουρού.
- 2) **Των επιχώριων μεταστάσεων**, όπου εκτός από τη χειρουργική αφαίρεση μπορεί να εφαρμοστεί η υπερθερμική περιοχική έγχυση χημειοθεραπευτικών και επικουρικές θεραπείες π.χ. ιντερφερόνη.
- 3) **Των απομακρυσμένων μεταστάσεων**, όπου γίνεται χειρουργική αφαίρεση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, χημειοανοσοθεραπεία, αλλά και βιολογικές θεραπείες με ιντερφερόνη, ιντερλευκίνη, μονοκλωνικά αντισώματα και εμβόλια<sup>29</sup>.

## Χημειοπροστασία

Με βάση μελετών που έγιναν σε πειραματόζωα, η καρκινογένεση διαιρείται σε τρεις φάσεις<sup>30</sup>. Την φάση έναρξης (initiation), την φάση προαγωγής (promotion) και την φάση προόδου (progression). Σε καθένα από τα παραπάνω στάδια προκαλούνται γενετικές ή φαινοτυπικές ανωμαλίες, όπως φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Σταδιοποίηση καρκινογένεσης

Στάδιο 1- Αρχική Φάση	Βλάβες DNA (γενετικές ανωμαλίες)
Στάδιο 2- Φάση Προαγωγής	Φαινοτυπικές ανωμαλίες
Στάδιο 3- Φάση Προόδου	Γενετικές και φαινοτυπικές ανωμαλίες

Με αυτή την προσέγγιση στην καρκινογένεση, οι μελέτες ως προς την παρεμπόδιση ανάπτυξης του καρκίνου βασίζονται στην υπόθεση ότι η διακοπή αυτής της διεργασίας σε ένα από τα στάδια θα αναστείλει ή θα ανατρέψει την εξέλιξη της καρκινογένεσης και επομένως θα μειώσει την επίπτωση της ασθένειας. Οι προσπάθειες πρόληψης εστιάζουν στο πρώτο στάδιο, ενώ ουσιαστικά η χημειοπροστασία στοχεύει στις δύο επόμενες (προαγωγής και προόδου).

Σύμφωνα με τη συμβατική ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Lee Wattenberg<sup>31</sup>, οι παράγοντες που εμφανίζουν χημειοπροφυλακτική δράση έναντι του καρκίνου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: α) στους ανασταλτικούς παράγοντες (blocking agents) και β) στους κατασταλτικούς παράγοντες (suppressing agents). Οι ανασταλτικοί παράγοντες εμποδίζουν την προσέγγιση των ιστών-στόχων από τα καρκινογόνα, γιατί εμπλέκονται στη μεταβολική τους ενεργοποίηση ή στην αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με σημαντικά μακρομόρια του κυττάρου (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι κατασταλτικοί παράγοντες από την άλλη πλευρά, παρεμποδίζουν την κακοήγη μεταμόρφωση των αρχικών κυττάρων, είτε στη φάση προαγωγής, είτε στη φάση προόδου. Αυτή όμως η κατηγοριοποίηση θεωρείται άκρως απλουστευμένη και πολυάριθμα κυτταρικά μόρια και διαδικασίες έχουν βρεθεί ότι αποτελούν δυνητικούς στόχους της δράσης των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων. Έτσι, η ικανότητα ενός μεμονωμένου χημειοπροφυλακτικού φυτοχημικού παράγοντα θα πρέπει να αναγνωρίζεται ως το αποτέλεσμα συνδυασμού αρκετών διακεκριμένων ενδοκυτταρικών δράσεων.

Ο μηχανισμός δράσης των φυτικών χημειοπροφυλακτικών παραγόντων είναι σύνθετος και κατηγοριοποιείται ανάλογα από τον μοριακό-στόχο δράσης ή από το είδος της δράσης. Οι μοριακές και κυτταρικές διαδικασίες που επηρεάζονται ή ρυθμίζονται από τις φυτοχημικές ενώσεις περιλαμβάνουν την καταστροφή των καρκινογόνων παραγόντων από τα ξеноβιοτικά ένζυμα του μεταβολισμού, την επιδιόρθωση του DNA, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την επίδραση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση, την έκφραση και λειτουργική ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την επίδραση στην αγγειογένεση και τη μετάσταση καθώς και την ορμονική και αυξητική κατάσταση των κακοήθων κυττάρων<sup>32,33</sup>.

Πολλές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά εμφανίζουν χημειοπροφυλακτική δράση έναντι του καρκίνου και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις ακόλουθες ομάδες:

1. Πολυφαινολικές ενώσεις
2. Τερπένια
3. Σουλφουδο-ενώσεις
4. Γλυκοσινολάτες-Ισοθειοκυανάτες
5. Αλκαλοειδή

6. Χλωροφύλλη και τα παράγωγά της
7. Σάκχαρα και παράγωγα σακχάρων
8. Λιπαρά οξέα
9. Άλλες ενώσεις

### **3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

Η ονομασία πολυφαινόλες δόθηκε σε φυσικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από περισσότερο του ενός κοινού αρωματικού δακτυλίου, που φέρει ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια συνδεδεμένα με τους δακτυλίους. Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτικά προϊόντα και διακρίνονται σε δεκατέσσερις μεγάλες κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κινναμμωμικά οξέα, κουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή και λιγνάνες. Οι περισσότερες μελετημένες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων είναι οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και οι λιγνάνες<sup>34</sup>.

Οι πολυφαινολικές ενώσεις απαντώνται κυρίως σε συζευγμένη μορφή, όπου ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρου συνδέονται, είτε με τις ομάδες υδροξυλίου, είτε μετα άτομα άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Τα σάκχαρα είναι δυνατόν να βρίσκονται με τη μορφή μονοσακχαριτών, δισακχαριτών ή και ολιγοσακχαριτών<sup>35</sup>. Μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων έδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση σε διάφορα πειραματικά μοντέλα<sup>36-38</sup>. Τα συστατικά αυτά φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων είναι η πρώτη που μελετήθηκε<sup>38</sup>. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι σημαντικοί ανταγωνιστές πολλών οξειδωτικών μορίων, όπως του οξυγόνου και πολλών ελεύθερων ριζών, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA και τη δημιουργία όγκων. Συγκεκριμένα, απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες αντιδρώντας με αυτές και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες.

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν επίσης σημαντική επίδραση στη βιοδραστικότητα των καρκινογόνων ουσιών<sup>36</sup>. Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με το DNA και τις περισσότερες φορές



απαιτείται να εξουδετερωθούν πριν φθάσουν στη Φάση I του μεταβολισμού. Εάν όμως προκληθεί μετάλλαξη και δεν επιδιορθωθεί, τότε είναι δυνατή η έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Αν δεν επιτευχθεί στην φάση I η απενεργοποίηση, τότε η καρκινογένεση μπορεί να απενεργοποιηθεί, μέσω σύζευξης των βιολογικών μορίων με τα μεταβολικά ένζυμα της Φάσης II, έτσι ώστε να σχηματισθεί ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο αποβάλλεται από τον οργανισμό. Αρκετά φλαβονοειδή (κερκετίνη, καιμφερόλη, γαλανγίνη, απιγενίνη, ναριγκίνη) αναστέλουν ένζυμα του κυτοχρώματος P<sub>450</sub>, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση καρκινογόνων παραγόντων στον άνθρωπο, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι ετεροκυκλικές αμίνες.

Επιπλέον, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι φαινολικές ενώσεις όπως οικατεχίνες, που περιέχονται στο τσάι, συμβάλλουν στην αύξηση της δράσης αρκετών οξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της αναγωγάσης της κινόνης<sup>39</sup>. Πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλοντας το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX-2) και της συνθετάσης του νιτρικού οξέος. Η χρόνια φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία πολλών μορφών καρκίνου και οι αναστολείς του ενζύμου της κυκλοοξυγενάσης (COX-2) θεωρούνται σημαντικοί προστατευτικοί παράγοντες έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου<sup>40,41</sup>. Τα τελευταία χρόνια διαπιστώθηκε ότι πολλές πολυφαινολικές ενώσεις εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική δράση σε μια σειρά ανθρώπινων κυτταρικών καρκινικών σειρών. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί στην εκδήλωση της συγκεκριμένης δράσης αναφέρονται στη διαταραχή των κυτταρικών μηνυμάτων και την κυτταρική ανάπτυξη, σε αναστολή δράσης ενζύμων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σε επαγωγή της διαδικασίας της απόπτωσης.

### 3.1. Φλαβονοειδή και συγγενείς ομάδες<sup>42-46</sup>

Τα Φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στα φυτά και προσδίδουν το χρώμα στους καρπούς και τα άνθη. Η διατροφική αλλά και η χημειοπροστατευτική αξία των πολυφαινολών έχει αποδειχθεί από πολλές επιστημονικές εργασίες τα τελευταία χρόνια. Στα φυτά βρίσκονται, είτε με τη μορφή αγλύκου, είτε με τη μορφή γλυκοσιδών. Οι γλυκοσίδες διακρίνονται σε Ο-γλυκοσίδες και (σε μικρότερο βαθμό) C-

γλυκοσίδες. Τα φλαβονοειδή είναι τόσο συχνά στη διατροφή του ανθρώπου και υπολογίζεται ότι κάθε άνθρωπος λαμβάνει τουλάχιστον 1g ημερησίως.

### **3.1.α Κατηγορίες φλαβονοειδών**

Η κατηγοριοποίηση γίνεται σε σχέση με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου. Έτσι έχουμε:

1. Παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυάνες
2. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης: φλαβόνες, φλαβονόλες, και τα διμερή τους, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, ισοφλαβανόλες, ξανθόνες.
3. Παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμανόνης: Φλαβάνες, φλαβαν-3-όλες, φλαβαν-3,4-διόλες, χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, κατεχίνες.
4. Παράγωγα της βενζυλιδενεκουμαρόνης: αουρόνες .

### **3.1.β Ισοφλαβόνες**

Οι ισοφλαβόνες είναι 3-φαινυλοχρωμόνες. Διαιρούνται σε 12 κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα οξειδωσης και το είδος του δακτυλίου που ενώνεται με το σκελετό της ισοφλαβόνης. Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο αντιμικητοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση.

### **3.1.γ Φλαβόνες - Φλαβονόλες**

Οι φυσικές φλαβόνες είναι συνήθως ολιγοϋδροξυλιωμένα παράγωγα. Ο βαθμός υδροξυλίωσης κυμαίνεται από 0 έως 7. Ο βαθμός υδροξυλίωσης μπορεί να έχει βιογενετική σημασία διότι σε χαμηλό βαθμό υδροξυλίωσης επικρατούν οι φλαβόνες (3-θέση ελεύθερη), ενώ οι πολυϋδροξυλιωμένες συνήθως είναι φλαβονόλες (με OH στη θέση C-3).

### **3.1.δ Ξανθόνες**

Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν των φλαβονών και φλαβονολών στο ότι ο φαινολικός δακτύλιος συνδέεται με το βενζοπυράνιο στη θέση 9,10. Οι ξανθόνες προκαλούν κυτταροτοξικότητα και αντικαρκινική δράση.

### **3.1.ε Ανθοκυάνες**

Παράγονται από το κατιόν 2-φαινυλοβενζοπυρίλιο, κοινώς ως κατιόν φλαβίλιο. Έχουν το γενικό τύπο, με OH στη θέση C-3. Παλαιότερα, ήταν

γνωστές γιατί προσδίδουν χρώμα στα άνθη και τους καρπούς. Πλέον είναι γνωστές και για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες.

### **3.2 Βιοσύνθεση των φλαβονοειδών:**

Όλα τα φλαβονοειδή προέρχονται από τη συσσωμάτωση αλάτων σικιμικού και μαλονικού οξέος. Λόγω του κοινού βιοσυνθετικού δρόμου όλα τα φλαβονοειδή έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό.

### **3.3 Μέθοδος απομόνωσης**

Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοσίδες τους είναι σταθερές ενώσεις και γι αυτό μπορούν να απομονώνονται με απλή εκχύλιση με ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες (νερό ή οργανικοί διαλύτες ή συνδιασμός). Μετά την εκχύλιση διαχωρίζονται με διάφορα συστήματα χρωματογραφίας (TLC, CC, DCCC, HPLC) και η ταυτοποίηση γίνεται φασματοσκοπικά (UV, IR, NMR, MS).

### **3.4. Φαρμακολογικές ιδιότητες**

#### **3.4.α Αντιφλεγμονώδης δράση**

Το 1930 ο Szant Györgi έδειξε ότι εκχυλίσματα από τα είδη του γένους Citrus αυξάνουν την αντίσταση (αντοχή) των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Αργότερα, αρκετοί ερευνητές μελετώντας αρκετά φλαβονοειδή διαπίστωσαν επί πλέον ότι διαθέτουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τη συμπεριφορά αυτή απέδωσαν στην αναστολή ορισμένων ενζυμικών συστημάτων, τα οποία εμπλέκονται κατά τη φάση ανάπτυξης και εξέλιξης της φλεγμονής<sup>47,48</sup>.

#### **3.4.β Δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα**

Γνωστή είναι η χρήση των εκχυλισμάτων των ειδών Grategus στη θεραπεία διαφόρων τύπων διαταραχών της καρδιάς. Επίσης οι πολυφαινόλες της οικογένειας Vitis π.χ. Vitis vinifera, έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρυνση. Το κόκκινο χρώμα του κρασιού οφείλεται σε πολυφαινολικές ενώσεις, όπως τις ανθοκυανιδίνες και τους γλυκοσίδες τους ανθοκυάνες και σε προανθοκυανιδίνες που είναι ολιγομερή παράγωγα φαλβον-3-ολες, ή φαλβον-3,4-διόλες .

Οι πολυφαινολικές ενώσεις του κρασιού έχουν προστατευτικό ρόλο στην αρτηριοσκλήρυνση. Έχουν αντιοξειδωτική δράση που παρεμποδίζει την

οξειδωση της LDL, επίσης υποχοληστεριναιμική δράση και βιταμινική δράση Ρ στα αγγεία, πιθανόν λόγω δέσμευσης των παραγομένων ελευθέρων ριζών<sup>49</sup>.

#### **3.4.γ Αντικαρκινική**

Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν τη σημαντική αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών σε κάθε επίπεδο της καρκινογένεσης<sup>50-52</sup>. Τα φλαβονοειδή του Citrus, ιδιαίτερα τα πολυμεθυλιωμένα παράγωγα, όπως tangeretin και nobiletin, παρουσιάζουν έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους από ότι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα<sup>53</sup>.

#### **3.4.δ Αντιοξειδωτική δράση**

Ο αριθμός και οι θέσεις των ομάδων ΟΗ και διπλών δεσμών C=C των φλαβονοειδών καθορίζουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται η κερκετίνη, μυρικετίνη, γκοσυπετίνη, κερκεταγενίνη. Η κερκετίνη εμποδίζει την οξειδωση των πολυακορέστων λιπαρών οξέων και προστατεύει στους χυμούς των εσπεριδοειδών από την αυτοοξειδωση της βιταμίνης C. Οι ενώσεις αυτές έχουν την ικανότητα να αντιδρούν κυρίως με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου είτε με αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς είτε με απόσπαση ατόμων υδρογόνου.

#### **3.4.ε Αντιθρομβωτική δράση**

Η δράση οφείλεται μάλλον στην αναστολή της σύνθεσης εικοσανοειδών. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν χαμηλό ποσοστό στεφανιαίας νόσου σε γαλλικές πόλεις, όπου οι κάτοικοι των περιοχών αυτών καταναλώνουν κόκκινο κρασί. Επίσης, τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών ελαττώνουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και δρουν αντιθρομβωτικά. Ο χυμός του λεμονιού μειώνει την χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ενώ του πορτοκαλιού ανεβάζει την HDL<sup>55,56</sup>.

## **4. ΤΟ ΡΟΔΙ**

### **4.1 Εισαγωγή και ιστορικές αναφορές**

Το ρόδι, *Punicagranatum*, γνωστό από την αρχαιότητα, είναι μοναδικό φρούτο, μυστηριώδες, και το κυρίαρχο μέλος από τα δύο είδη που αποτελούν την οικογένεια *Lythraceae* ή (*Punicaceae*). Το δεύτερο μέλος της οικογενείας, *Punicaprotorunica*, είναι λιγότερο διαδεδομένο και φύεται μόνο στο νησί Σοκότρα της Υεμένης<sup>57</sup>.

Το ρόδι στην αρχαιότητα χρησιμοποιήθηκε ως σύμβολο ζωής, αναγέννησης, γονιμότητας και αφθονίας και θεωρείτο ιερό σε διάφορους πολιτισμούς και θρησκείες<sup>58,59</sup>, πολύ πριν ακόμη περιγραφούν οι ιατρικές του ιδιότητες. Στην Ελληνική Μυθολογία υπάρχουν πολλές αναφορές στην ροδιά. Ήταν το χαρακτηριστικό φρούτο του Άδη, το οποίο κατανάλωσε η Περσεφόνη λίγο πριν απελευθερωθεί από τον κάτω κόσμο. Αυτό το γεγονός έκανε το ρόδι να αποκτήσει κυρίαρχο συμβολικό χαρακτήρα στα Ελευσίνια Μυστήρια, τα οποία σηματοδοτούσαν το τέλος του χειμώνα και τον ερχομό της άνοιξης. Σύμφωνα με την Ελληνική μυθολογία, όταν ο Πλούτωνας απήγαγε την Περσεφόνη μεταφέροντάς την στον Κάτω Κόσμο, της πρόσφερε ένα ρόδι από το οποίο αυτή έφαγε μόνο λίγα σπόρια. Αυτό την καταδίκασε να περνά το μισό χρόνο του έτους με τον Πλούτωνα (χειμώνας) και τον άλλο μισό με τους ζωντανούς στον Επάνω Κόσμο<sup>60</sup>.

Στις θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού αναφέρονται ο Όμηρος, Θεόφραστος, Διοσκουρίδης<sup>61</sup> και Πλίνιος, ο οποίος μάλιστα περιγράφει τα ρόδια της Καρχηδόνας ως την καλύτερη ποικιλία της εποχής του. Ο χυμός του ροδιού ανά τους αιώνες έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση διαφόρων νόσων. Στην αρχαία Ελλάδα οι γιατροί το χρησιμοποιούσαν ως αντιφλεγμονώδες, κατά της ελμινθίασης (σκώληκες των εντέρων) και αντιβηχικό. Στη Μέση Ανατολή, τα ρόδια χρησιμοποιούνταν για πολλές παθήσεις όπως αιμορροΐδες, αμυγδαλίτιδα, επιπεφυκίτιδα, ακόμη και για τη φαλάκρα<sup>62</sup>. Χρησιμοποιούνταν και για την θεραπεία της χρόνιας διάρροιας και δυσεντερίας επίσης και σαν αποφρακτικό του βλεννογόνου, για την θεραπεία αιμορραγιών και νυχτερινές επιδρώσεις<sup>62,63</sup>.

Σήμερα, ιατρικές έρευνες επιβεβαιώνουν τον πλούτο πληροφοριών σχετικά με τις πολλαπλές ιδιότητες του ροδιού που παρέχει η ιστορία και η μυθολογία. Η έρευνα δείχνει επιστημονικά πλέον ότι αυτό το φρούτο περιέχει

άφθονα αντιοξειδωτικά και θρεπτικά συστατικά, ευεργετικά για την υγεία και την αντιμετώπιση διαφόρων νόσων.

## 4.2 Περιγραφή του φυτού

Η ροδιά, Pomegranate, είναι φυλλοβόλος θάμνος ή δένδρο, που φθάνει σε ύψος τα 5-6 μέτρα. Έχει λεπτά κλαδιά τα οποία ξεκινούν κατακόρυφα και γέρνουν προς τα έξω, σπείρες από λογχοειδή φύλλα, άλικά άνθη και στρογγυλούς καρπούς, που έχουν φλούδα σκληρή σαν πετσί και περιέχουν πολλά σπέρματα καλυμμένα με ζελατινώδη ουσία. Τα λεπτά κλαδιά είναι καλυμμένα με αγκάθια. Οι ακλάδευτοι θάμνοι έχουν σαφώς γυρτή ή σε σχήμα σιντριβανιού μορφή. Τα φύλλα είναι γυαλιστερά και έχουν μήκος οκτώ εκατοστά.

Οι ροδιές έχουν όμορφα πορτοκαλοκίτρινα λουλούδια σε σχήμα τρομπέτας με πτυχωτά πέταλα. Τα άνθη έχουν μήκος πέντε εκατοστά είναι συχνά διπλά και ανθίζουν για μεγάλο διάστημα το καλοκαίρι<sup>62</sup>. Ιθαγενές φυτό της Νοτιοδυτικής Ασίας, η ροδιά έχει εγκλιματιστεί στην Ευρώπη. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το ρόδι πρωτοεμφανίστηκε στην Περσία, και σιγά-σιγά προχώρησε στην Ινδία, βόρειο Αφρική, Ευρώπη, Κίνα και Αμερική. Είναι από τα πρώτα φρούτα καλλιέργειας: τουλάχιστον από το 3000 π.Χ., ήνωρίτερα. Στις κοιλάδες του Τίγρη-Ευφράτη, τον Νείλο και τα ποτάμια της Ινδίας. υπήρχαν κήποι με σταφύλια, ελιές, σύκα, χουρμάδες, αμύγδαλα και ρόδια. Η ροδιά προσαρμόζεται εύκολα σε διαφορετικά εδάφη και είναι ανθεκτική σε πολύ σκληρές συνθήκες ζέστης, ξηρασίας και έλλειψης φροντίδας. Θεωρητικά η ροδιά μπορεί να ζήσει πάνω από 200 χρόνια. Ως απόδειξη επικαλούνται τα δένδρα ροδιάς, που είναι τουλάχιστον 200 χρόνια στους κήπους των Βερσαλλιών της Γαλλίας. Το δένδρο καλλιεργείται ευρύτατα για τους καρπούς του που είναι φαγώσιμοι και ωριμάζουν το φθινόπωρο<sup>62,63</sup>. Ο καρπός περικλείει εσωτερικά πολλούς κόκκους (σπυριά), οι οποίοι με τη σειρά τους περιβάλλονται από κίτρινες μεμβράνες, ενώ εξωτερικά στο κάτω μέρος του υπάρχει η προεξοχή που είναι ότι έχει απομείνει από το προγενέστερο άνθος. Το ρόδι απαρτίζεται από τρία βασικά μέρη και κάθε μέρος έχει το δικό του μεταφυσικό, βοτανολογικό και χημικό χαρακτήρα. Αυτά είναι οι σπόροι ή "επισπέρμιο", ο χυμός και ο φλοιός.

Όλα τα τμήματα της ροδιάς, ρίζα, φύλλα και άνθη, περιέχουν ιδιαίτερα και μοναδικά συστατικά και το καθένα παρουσιάζει πολλαπλές και ενδιαφέρουσες ιδιότητες όταν χρησιμοποιείται σαν φάρμακο για ανάλωση από ανθρώπους και

ζώα<sup>62</sup>. Από την εποχή της αρχαιότητας, ο χυμός των σπόρων μετά από ειδική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση ανθεκτικών βαφών και μελάνης, ενώ σήμερα ο χυμός χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική και στην ποτοποιία.

### 4.3. Δραστικά συστατικά του ροδιού

Το ρόδι είναι πλούσιο σε βιταμίνες A,B,C,E μεταλλικά ιόντα, όπως ασβέστιο (Ca), κάλιο (K), νάτριο (Na), σίδηρο (Fe), αλλά και φωσφόρο (P), σελήνιο (Se) και **αντιοξειδωτικές** ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες ενώ είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε θερμίδες<sup>64</sup> (Πίνακας 5).

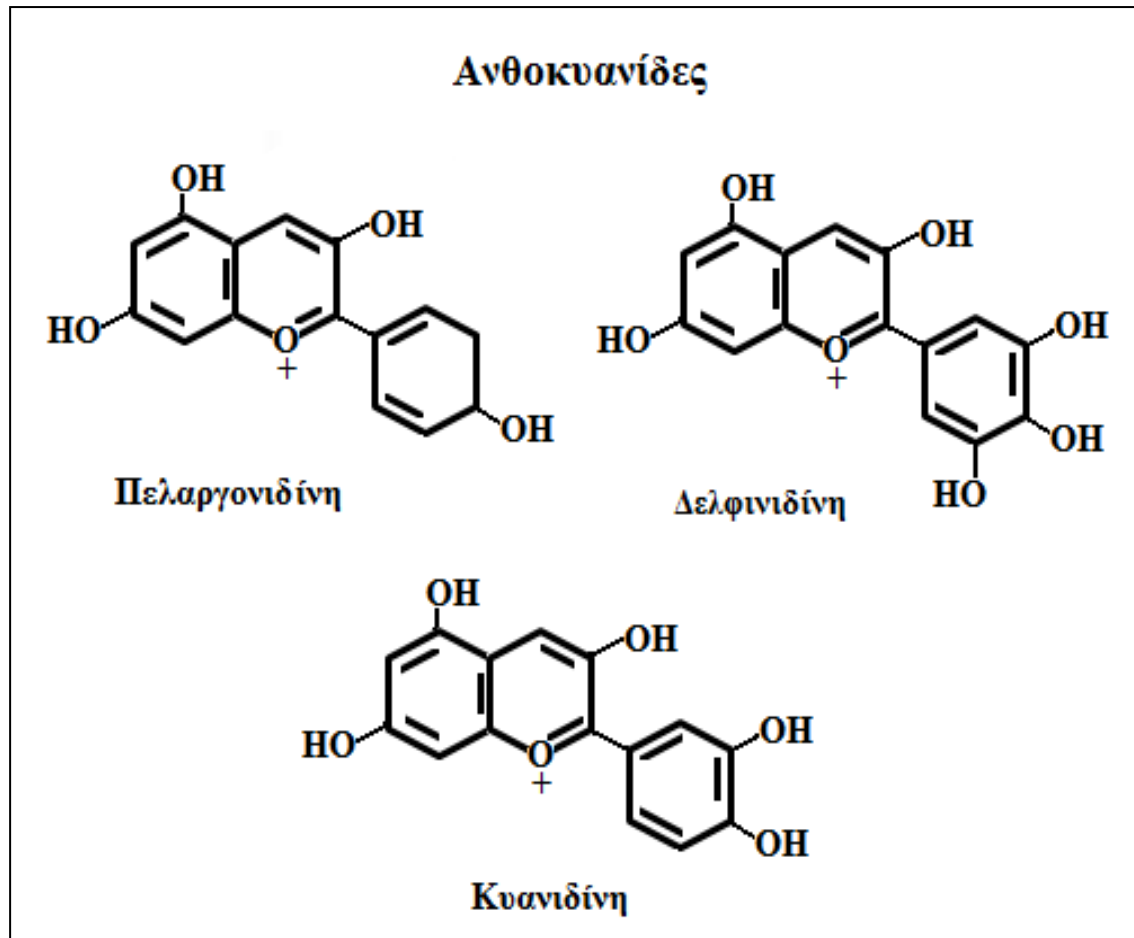
Ο χυμός από τον καρπό της ροδιάς (PomegranateFruitExtract, PFE) περιέχει υψηλά επίπεδα πολυφαινολικών ενώσεων όπως:

1. Ανθοκυανίνες (γλυκοζίτες της κυανιδίνης, δελφινιδίνης, πελαργονιδίνης)<sup>65,66</sup> (Εικόνα 3).
2. Ελλαγικό οξύ σε ελεύθερη και συνδεδεμένη μορφή της (ως ελλαγιταννίνες (π.χ. punicalgin), είναι βιοενεργή ένωση υπεύθυνη για παραπάνω από 50 % της αντιοξειδωτικής ικανότητας του χυμού ροδιού, και γλυκοζίτες ελλαγικού οξέος<sup>65</sup>.
3. Γαλλικό οξύ σε ελεύθερη και συνδεδεμένη μορφή της (ως γαλλοταννίνες και γλυκοζίτες γαλλικού οξέος)<sup>65</sup>.
4. Φλαβονοειδή (κερκετίνη, καιμφερόλη, λουτεολίνη)<sup>65</sup>.

**Πίνακας 5.**Διατροφική ανάλυση ανά ρόδι (περίπου 280 gr)<sup>65</sup>

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>	<b>ΕΝΕΡΓΕΙΑ 234kcal</b>
<b>Πρωτεΐνες</b>	4,71 gr.
<b>Λιπαρά</b>	3,30 gr.
<b>Υδατάνθρακες</b>	52,73 gr.
<b>Φυτικές ίνες</b>	11,3 gr.
<b>Ασβέστιο</b>	28 mg
<b>Σίδηρο</b>	0,85 mg
<b>Μαγνήσιο</b>	34 mg
<b>Φώσφορο</b>	102 mg
<b>Κάλιο</b>	666 mg
<b>Νάτριο</b>	8 mg
<b>Ψευδάργυρος</b>	0,99 mg
<b>Χαλκός</b>	0,446 mg
<b>Σελήνιο</b>	1,4 mcg
<b>Βιταμίνη C</b>	28,8 mg
<b>Νιασίνη (B3)</b>	0,826 mg
<b>Φυλλικό οξύ</b>	107 mcg
<b>Βιταμίνη E</b>	1,69 mg
<b>Βιταμίνη K</b>	46,2 mcg





**Εικόνα 3.** Ανθοκυανίνες: πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη.

Τις τελευταίες δεκαετίες έγινε σημαντική πρόοδος στην θεμελίωση των φαρμακολογικών μηχανισμών του ροδιού και μεμονωμένων συστατικών του. Εκχύλισμα από κάθε μέρος του καρπού φαίνεται να έχει θεραπευτικές ιδιότητες<sup>67</sup>, και μερικές μελέτες αναφέρουν ότι επιπλέον τα φύλλα, η ρίζα και ο φλοιός της ροδιάς έχουν επίσης θεραπευτικά ωφέλη<sup>68</sup> (Πίνακας 6).

Τα πιο ωφέλιμα συστατικά του εκχυλίσματος του ροδιού φαίνεται ότι είναι:

- Ελλαγικό οξύ, ελλαγιταννίνες (punicalagins)<sup>69,70</sup>.
- Punicalic acid - ένα σπάνιο ακόρεστο λιπαρό οξύ με 18 άτομα άνθρακα (από άποψη δομής σχετίζεται με το συζυγές λινολεϊκό οξύ)<sup>71</sup>.
- Ανθοκυανίνες, ανθοκυανιδίνες<sup>66</sup>.
- Φλαβονοειδή<sup>65</sup>.
- Οιστρογονική φλαβονόλη και φλαβόνη<sup>65</sup>.

**Πίνακας 6.** Μέρη του ροδιού και τα φυτοσυστατικά τους<sup>63</sup>.

<b>Μέρη του φυτού και του καρπού</b>	<b>Φυτοσυστατικά</b>
<b>Χυμός του ροδιού</b>	Ανθοκυανίνες, γλυκόζη, ασκορβικό οξύ, ελλαγικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κατεχίνη, EGCG, κερκετίνη, ρουτίνη, πολυάριθμα μέταλλα: π.χ. σίδηρος, αμινοξέα
<b>Έλαιο σπόρων του ροδιού</b>	95% πουνικικό οξύ, άλλα συστατικά περιλαμβανόμενα ελλαγικού οξέος, άλλα λιπαρά οξέα, στερόλες
<b>Φλοιός-περικόρπιο του ροδιού</b>	Γαλλικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα; κατεχίνη, EGCG, κερκετίνη, ρουτίνη, και άλλα φλαβονοειδοί, φλαβόνες, φλαβονόνες; ανθοκυανίνες
<b>Φύλλα ροδιάς</b>	Ταννίνες(πουνικαγαλίνη και πουνικαφολίνη) και φλαβονογλυκοζίδες, περιλαμβανομένου λουτεολίνης και απιγενίνης
<b>Άνθη ροδιάς</b>	Γαλλικό οξύ, ουρσολικό οξύ; τριτερπενοειδή, περιλαμβανομένου του maslinicacid και ασιατικό οξύ; άλλα μη προσδιορισμένα στοιχεία
<b>Ρίζα και φλοιός της ροδιάς</b>	Ελλαγιταννίνες, Πολυάριθμα πιπεριδινό αλκαλοειδή (piperidine)

#### **4.4. Θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού**

Το ρόδι θεωρείται, ως ένα από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά και αντικαρκινικά φυτικής προέλευσης (φυτοχημικό) εδώδιμο. Οι χαρακτηριστικές του ιδιότητες έχουν περιγραφεί σε πολλές μελέτες. Παρόλο, που οι θεραπευτικές του ιδιότητες καλύπτουν διάφορες οδούς προστασίας, όμως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον φαίνεται να απορρέει από την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση του.

##### **4.4.α Αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.**

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού συμβάλλουν στην αντιμετώπιση πολλών προβλημάτων υγείας, στις οποίες περιλαμβάνονται παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος και τα αίτια αυτών:

- Η αθηροσκλήρωση. Κατανάλωση χυμού ροδιού επί τριετία από ασθενείς με στένωση της καρωτιδικής αρτηρίας μειώνει την κοινή πάχυνση του εσωτερικού της καρωτίδας, την πίεση του αίματος και την οξειδωση της HDL σε LDL<sup>72</sup>.
- Υπέρταση. Σημαντική φαίνεται να είναι η δράση του ροδιού στη μείωση της υψηλής αρτηριακής πίεσης<sup>72-74</sup>.
- Υπερλιπιδαιμία. Συμπυκνωμένος χυμός ροδιού βελτιώνει την παρουσία λιπιδίων σε διαβητικούς ασθενείς με υπερλιπιδαιμία και μπορεί να βελτιώσει τους παράγοντες που ευθύνονται για τις καρδιακές παθήσεις<sup>72</sup>.

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ροδιού συμβάλλουν στην προστασία του ήπατος<sup>75</sup> και των νεφρών<sup>76</sup> από τη βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Επίσης PFE φαίνεται να είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση των βακτηρίων<sup>76,77</sup> και την ενίσχυση της δράσης άλλων αντιοξειδωτικών (χυμού μαύρου σταφυλιού, χυμού των μαύρων μούρων, κόκκινου κρασιού, πράσινου τσαγιού)<sup>78</sup>.

Πόση χυμού ροδιού κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κινδύνου εγκεφαλικών κατώσεων στα βρέφη<sup>79</sup>. Το εκχύλισμα του ροδιού μπορεί να μειώσει την φθορά των χόνδρων εμποδίζοντας τα ένζυμα που συμβάλλουν στην οστεοαρθρίτιδα<sup>80,81</sup>.

#### **4.4.βΕπίδραση στον καρκίνο του προστάτη**

Ο χυμός ροδιού στον καρκίνο του προστάτη επιβραδύνει το χρόνο διπλασιασμού του PSA (ο διπλασιασμός του μάρτυρα θεωρείται ένδειξη ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη), καθυστερεί τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και προκαλεί τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων<sup>82</sup>. Το εκχύλισμα ροδιού μπορεί να προλάβει τον καρκίνο του προστάτη ή να επιβραδύνει την εξάπλωσή του<sup>83</sup>. Όταν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη εισήχθησαν σε ποντικούς, χορήγηση εκχυλίσματος ροδιού στη συνέχεια καθυστέρησε την εμφάνιση νεοπλασιών. Η ανάπτυξη των όγκων αναστάληκε σημαντικά και επιμηκύνθηκε ο χρόνος ζωής. Στους άνδρες με επανεμφανιζόμενο καρκίνο του προστάτη, ποσότητα 8 oz την ημέρα χυμού ροδιού επιμηκύνει σημαντικά το χρόνο αύξησης των επιπέδων του ειδικού προστατικού δείκτη (PSA), που αποτελεί ένδειξη καρκίνου του προστάτη<sup>84</sup>.

#### 4.4.γ Επίδραση στο δέρμα.

Το εκχύλισμα ροδιού μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία όγκων του δέρματος, τουλάχιστον σε ποντίκια τα οποία εκτέθηκαν σε καρκινογόνους παράγοντες<sup>85</sup>. Επιπλέον, ποντίκια στα οποία εφαρμόστηκε θεραπευτική αγωγή με χυμό ροδιού παρουσίασαν λιγότερους όγκους από εκείνα που δεν είχαν υποστεί αυτή τη θεραπεία.

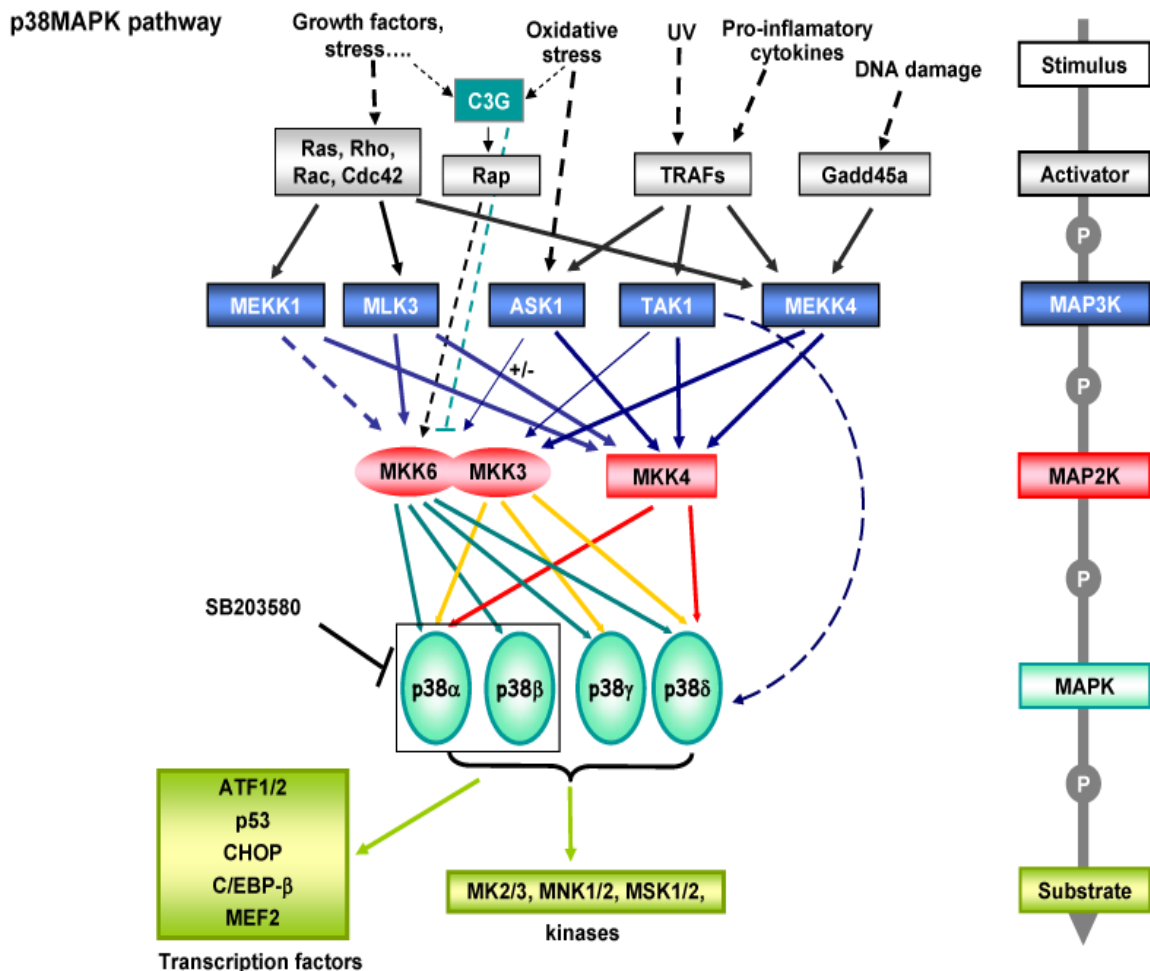
## 5. P38 MAPK ΚΙΝΑΣΕΣ

### 5.1 Γενικά

Η υπο-οικογένεια των p38 πρωτεϊνικών κινασών ανήκουν στην οικογένεια των MAPKs. Ενεργοποιούνται από σήματα του οξειδωτικού στρες και από τις κυτταροκίνες του μονοπατιού της φλεγμονής. Παρόλα αυτά, ενεργοποιούνται και από μη στρεσογόνους παράγοντες που οδηγούν στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση και επιβίωση). Έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα τέσσερα διαφορετικά μέλη της οικογένειας p38, η p38α, β, γ και δ, είναι γνωστά και σαν SAPK2a, SAPK2b, SAPK3 και SAPK4 αντίστοιχα. Η ονομασία SAPK προέρχεται από τον χαρακτηρισμό stress-activated kinase και σχετίζεται με την ικανότητά τους να ενεργοποιούνται σε κατάσταση στρες του κυττάρου<sup>86-88</sup>. Η p38α αρχικά ταυτοποιήθηκε ως πρωτεΐνη 38 KDa, η οποία είχε την χαρακτηριστική ικανότητά να φωσφορυλιώνεται στην τυροσίνη σαν απάντηση στη βακτηριακή ενδοτοξίνη LPS<sup>89</sup>. Την ίδια εποχή άλλοι ερευνητές την ταυτοποίησαν την p38α σαν μία κινάση που ενεργοποιείται από την IL-1<sup>90,91</sup>. Το 2000 διάφορες εργασίες κατέληξαν ότι η p38α, που κωδικοποιείται από το γονίδιο MAPK14, είναι η συχνότερη μορφή των p38 που συναντάμε στα κύτταρα. Στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου της p38α έχει σαν αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό θάνατο<sup>92-94</sup>.

Οι p38 MAPKs οι βασικοί ενεργοποιητές των p38 MAPKs είναι οι MKK και κυρίως την MKK6. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορούν να ενεργοποιηθούν και από μονοπάτια ανεξάρτητα των MKK<sup>86</sup>. Μετά την ενεργοποίησή τους οι p38 φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι p53, ATF2, MEF2, MAPKAP-K2, MAPKAP-K3, MNK-1, MNK-2 (MAP kinase interacting ser/thr kinase 1 and 2), MSK-1 (mitogen and stress activated protein

kinases) και άλλους<sup>86,95</sup> (Εικόνα 4). Αρχικά οι αναλύσεις λειτουργίας της p38α έγιναν μέσω των αναστολέων της SB203580 και SB202190 (πηρυνομιδαζόλες). Οι αναφερόμενοι αναστολείς δρουν πάνω στην p38α, αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις επιδρούν και στην p38β<sup>88</sup>.



**Εικόνα 4.** Το μονοπάτι ενεργοποίησης των p38 MAPKs. Διάφορα σήματα και κυρίως αυτά του οξειδωτικού στρες ενεργοποιούν το μονοπάτι από σύμπλοκα κινασών. Άπαξ και ενεργοποιηθούν οι p38 φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης<sup>86</sup>.

## 5.2 Ο διπλός ρόλος της p38 MAPK στον κυτταρικό θάνατο.

Η p38 MAPK παίζει διπλό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, και τούτο συμβαίνει επειδή μεσολαβεί τότε στην επιβίωση και τότε στον κυτταρικό θάνατο, μέσω όμως διαφορετικών μηχανισμών όπως η απόπτωση. Επιπλέον, η δράση της p38 MAPK στην απόπτωση φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, τον ενεργοποιητή και την ισομορφή<sup>88,95</sup>. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι p38α

και p38β παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόπτωση νευρικών κυττάρων<sup>96-98</sup> και καρδιακών κυττάρων<sup>99-101</sup>.

Η δράση της p38 όπως προαναφέρθηκε φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο αλλά και από την ισομορφή της συγκεκριμένης κινάσης. Έχει αναφερθεί σε εργασίες ότι η υπερέκφραση της p38α προκαλεί απόπτωση σε καρδιακά κύτταρα με μεταλλαγμένο MKK3bE, ενώ η υπερέκφραση της p38β ενισχύει την επιβίωση στα ίδια κύτταρα<sup>88</sup>. Επίσης, η ίδια η p38α φαίνεται πως αποτρέπει την απόπτωση σε αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί υποξία<sup>102</sup>.

### **5.3 Ο ρόλος της p38α στον καρκίνο και τη θεραπεία του**

Αρκετές βιβλιογραφίες αναφέρουν ότι η p38α δρα σαν αναστολέας της δημιουργίας όγκου<sup>95</sup>. Απέδειξαν δηλαδή, ότι η p38α ρυθμίζει αρνητικά την κακοήγη μεταλλαγή που προκαλείται από το μονοπάτι της Ras σε κυτταρικές σειρές MEFs<sup>103</sup>. Αντίθετα, στο ακανθοκυτταρικό μελάνωμα μέσα από το μονοπάτι p38α→ATF6→Rheb→mTOR παρατηρείται αντίσταση στη φαρμακευτική θεραπεία<sup>104</sup>. Μετά από εκτενή μελέτη τελικά διαπιστώθηκε η καθοριστική δράση της p38α σε αιμοποιητικές κακοήθειες όπως η λευχαιμία.

Η p38α διατηρεί σε ισορροπία το ισοζύγιο του πολλαπλασιασμού ή του κυτταρικού θανάτου διεγείροντας αναλόγως μονοπάτια της φυσιολογικής ρύθμισης της αιμοποίησης<sup>105,106</sup>. Έτσι, απώλεια ή υπερπαραγωγή της αναφερόμενης κινάσης μπορεί να οδηγήσει σε μυελοδυσπλαστικά ή μυελοπολλαπλασιαστικά σύνδρομα<sup>107,108</sup>.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι p38 MAPKs εμπλέκονται στην απάντηση σε παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA και χρησιμοποιούνται ως θεραπεία για τον καρκίνο, όπως η UV ακτινοβολία, το cis-platinum και το Ara-C<sup>109-111</sup>.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Στο μέρος αυτό της διατριβής αναφέρονται τα υλικά οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν και παρουσιάζονται οι μέθοδοι απομόνωσης του πολυφαινολικού εκχυλίσματος με ρητίνες προσρόφησης, μελέτης απόπτωσης σε κυτταρικές σειρές και ανίχνευσης ποσότητας και αναστολής της p38 MAP κινάσες.

##### **6.1 Υλικά**

- Ρητίνες XAD4, XAD16, XAD-7HD
- Στήλη προσρόφησης
- Μικροπλάκες ELISA (Διατίθενται με τα κιτ)
- Φωτόμετρο, sanofipauster
- Φωτόμετρο BiotechIntl.
- Ολικό εκχύλισμα ροδιού (η ονομασία του σκευάσματος δε δίδεται για δεοντολογικούς λόγους).

##### **6.2. Αντιδραστήρια**

**6.2.α Αντιδραστήρια απομόνωσης πολυφαινολικών ενώσεων ροδιού**

- Αιθανόλη 96%
- NaCl
- NaCO<sub>3</sub>

## 6.2.β Αντιδραστήρια για την ανίχνευση της p38 στις κυτταρικές σειρές

### A. Για την εξαγωγή των κυττάρων

- 10mM Tris, pH 7.4
- 100mM NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM EGTA
- 1mM NaF
- 20mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>
- 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- 1% Triton X-100
- 10% glycerol
- 0.1% SDS
- 0.5 % deoxycholate
- 1mM PMSF(0.3M σε DMSO)
- Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (SigmaCat. #P-2714)

Προσθέτουμε 250μL για κάθε 5mL buffer εξαγωγής πρωτεϊνών. Η σταθερότητά τους στο buffer είναι για 24 h στους 4 βαθμούς Κελσίου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το buffer είναι σταθερό για 2-3 εβδομάδες στους 4 °C. Προσθέτουμε το PMSF και το κοτέιλ αναστολέων πριν τη χρήση.

### B. Για την ανίχνευση p38 ELISA KIT, Biosource Intl.

- Στάνταρ p38 MAPK (ph 180/182)
- Αζίδιο του νατρίου
- HRP-αντίσωμα
- Διαλύτης, 3mM θυμόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
- Χρωμοδόνο τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMP)
- Διάλυμα περάτωσης της αντίδρασης H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



### 6.2.3 Αντιδραστήρια για τις καλλιέργειες και τον έλεγχο πολλαπλασιασμού των κυττάρων

- RPMI 1640
- TSI
- DMSO
- FBS
- Τρυψίνη
- PBS 0.1% (w/v)]
- Na<sub>2</sub>EDTA
- CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes)
- L-glutamine
- SRB (sulphorhodamine B-χρωστική)
- trizma base

### 6.2.4 Αντιδραστήρια ελέγχου αναστολής της p38

- Μικροπλάκα με το μονιμοποιημένο υπόστρωμα
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 10x (2% Tween -20) 100mL
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1X για τη δράση της κινάσης που χρησιμοποιείται σαν διάλυμα αραίωσης 20 mL.
- Λυοφιλοποιημένο άλας ATPNa<sub>2</sub>. Ανασυστάθηκε σε νερό με τελική συγκέντρωση 1.25 mM. Πριν το πείραμα διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης με τελική συγκέντρωση 62.5 μM.
- Πολυκλωνικό αντίσωμα anti-phospho ATF2 12mL.
- HRP conjugated Anti-rabbit IgG 12 mL.
- TMB (tetra-methylbenzidine) 12mL.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5N 12mL.
- P38 θετικός μάρτυρας 2 units/μL. Χρειάστηκε αραίωση στα 10m units/well. Αραιώσαμε 1/10 και προσθέσαμε στο πηγαδάκι του πειράματος 10 μL. MBL intl. cat#CY-E1177.
- 10X SB 202190 (20μM)

## 7.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ-ΡΗΤΙΝΕΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

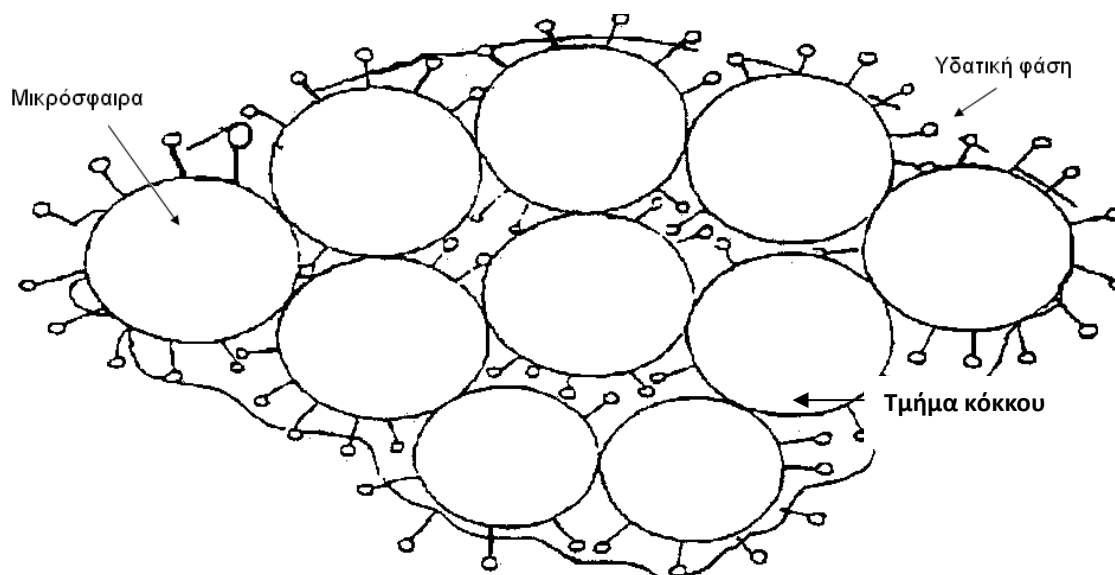
### 7.1 Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι μια διαδικασία διαχωρισμού, η οποία συνίσταται στην εκλεκτική συγκέντρωση των μορίων της μίας φάσης (υγρής ή αέριας) πάνω σε στερεές επιφάνειες (δεύτερη φάση). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όλες οι επιφάνειες των στερεών δεν είναι λείες σε μικροσκοπική κλίμακα αλλά ανώμαλες, με “κοιλιάδες” και “όρη” να εναλλάσσονται σε όλη την επιφάνεια. Αυτές οι περιοχές των ανωμαλιών υπόκεινται σε ελλειμματικά πεδία δυνάμεων και εκεί έχουμε αυξημένη ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια. Σε αυτές τις θέσεις τα επιφανειακά άτομα του στερεού μπορούν να ασκήσουν ελκτικές δυνάμεις σε άλλα άτομα ή μόρια από την περιβάλλουσα αέρια ή υγρή φάση.

Τα στερεά υλικά είναι καλύτερα προσροφητικά μέσα όσο πιο λεπτό καταμερισμό έχουν, δηλαδή όσο μεγαλύτερο ποσοστό κολλοειδών διαστάσεων έχουν, και όσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός πόρων που διαθέτουν.

### 7.2 Μηχανισμός προσρόφησης

Η φυσική δομή ενός κόκκου ρητίνης ΧΑD μπορεί να αποδοθεί σχηματικά με την Εικόνα 5, όπου φαίνεται τμήμα κόκκου σε σύνδεση με μόριο (-α)



Εικόνα 5. Φυσική δομή ενός κόκκου ρητίνης ΧΑD

Ένας απλός κόκκος αποτελείται από συσσωματώματα πολύ μικρών σφαιρών. Η δομή του πόρου μοιάζει με ανοικτό κύτταρο και συνεπώς το νερό μπορεί εύκολα να διεισδύει σε αυτόν. Η ρητίνη XAD έχει μια συνεχή gel φάση και μια συνεχή πορώδη φάση. Κατά την προσρόφηση το υδρόφοβο τμήμα του μορίου προσροφάται στην υδρόφοβη επιφάνεια της ρητίνης ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται προς την υδατική φάση.

Συνήθως τα προσροφημένα μόρια δεν εισχωρούν σημαντικά στη φάση των μικροσφαιρών αλλά συγκρατούνται στην επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η εκρόφηση και οι τεχνικές αναγέννησης. Η εκλεκτικότητα και η έκταση της προσρόφησης οργανικών ουσιών στις ρητίνες αυξάνει με την αύξηση της υδροφοβικότητας του οργανικού μορίου. Οι δυνάμεις που κυριαρχούν είναι τύπου VanderWaals.

### **7.3 Ρητίνες προσρόφησης**

Οι ρητίνες προσρόφησης είναι πολυμερείς οργανικές ενώσεις (συνήθως προϊόντα συμπολυμερισμού στυρολίου και διβινυλοβενζολίου), αδιάλυτες στο νερό και οργανικούς διαλύτες. Οι μακροδικτυωτές αυτές ρητίνες (macroreticularresins) είναι σκληρά, αδιάλυτα σφαιρίδια πορώδους πολυμερούς με κυμαινόμενες φυσικές ιδιότητες από αισθητά μη πολικές μέχρι πολύ πολικές. Είναι διαθέσιμες με διαφορετικές χημικές συγγένειες (affinities) και χωρητικότητες για την απομάκρυνση χημικών και φαρμακευτικών ουσιών από αραιά υγρά μίγματα.

Οι ρητίνες προσροφήσεως έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δέσμευση και ανάκτηση φαινολικών παραγώγων από τα βιομηχανικά απόβλητα φλαβονοειδών από τα απόβλητα βιομηχανιών επεξεργασίας εσπεριδοειδών και λιποϊκού οξέος από τα απόβλητα βιομηχανιών παραγωγής του. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κάθε ερευνητής πρέπει να επιλέξει τον τύπο της προσροφητικής ρητίνης που θα χρησιμοποιήσει, αφού πραγματοποιήσει ορισμένους ελέγχους, ώστε να προσεγγίσει την αριστοποίηση του συστήματος.

Το μέγεθος των κόκκων της ρητίνης πρέπει να είναι αρκετά μικρό, ώστε η επιφάνεια επαφής να είναι μεγάλη, όχι όμως και τόσο πολύ μικρό, ώστε η ταχύτητα ροής, στην περίπτωση χρησιμοποίησεως στήλης, να μην είναι πολύ μικρή. Οι διακλαδώσεις στο συμπολυμερές μόριο της ρητίνης συνήθως συνίστανται από διβινυλοβενζόλιο ή φορμαλδεΐδη. Ο αριθμός διακλαδώσεων

(degree of cross-linkage) εκφράζεται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα σε διβινυλοβενζόλιο και είναι συνήθως 8-10. Ο αριθμός διακλαδώσεων μιας ρητίνης επηρεάζει δραστικά τη συμπεριφορά της. Αύξησή του συνεπάγεται αύξηση της συνεκτικότητας της ρητίνης και συνεπώς μείωση της διόγκωσής της κατά την επαφή με νερό, μείωση του πορώδους και της διαλυτότητας, μείωση της ταχύτητας ροής δια μέσου της στήλης, αύξηση της ανταλλακτικής χωρητικότητας και μείωση της ταχύτητας προσροφήσεως. Ουσιώδες χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρητινών είναι η αντιστρεπτότητα, εξαιτίας της οποίας είναι δυνατή η αναγέννηση και συνεπώς η επαναχρησιμοποίησή τους.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος καθαρισμού των υγρών αποβλήτων βιομηχανιών, που περιέχουν οργανικές ουσίες είναι οι ρητίνες προσρόφησης καθώς παρουσιάζουν πολύ μεγάλη προσροφητική ικανότητα και με αυτό τον τρόπο πλεονεκτούν σε σχέση με τα υπόλοιπα προσροφητικά μέσα (γέλη πυριτίου, αλουμίνα, ενεργός άνθρακας). Οι ρητίνες αυτές είναι μακροπορώδεις πολυμερικοί προσροφητές και κάθε τύπος ρητίνης διαθέτει ξεχωριστά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα να προσφροφά και διαφορετικά συστατικά. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των συστατικών του χυμού του ροδιού. Στην επιφάνεια των ρητινών XAD-4 και XAD-16 προσροφούνται τα φαινολικά συστατικά σχετικά μικρού μοριακού βάρους ενώ η ρητίνη XAD-7HP έχει την ικανότητα δέσμευσης συστατικών μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

#### **7.4 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ρητινών XAD-4, XAD-16, XAD-7HP**

Οι πολυμερικοί προσροφητές (ρητίνες) Amberlite XAD χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την απομάκρυνση και επανάκτηση φαινολών, αντιβιοτικών, φυτοφαρμάκων που περιέχουν χλώριο και διαφόρων άλλων αρωματικών και αζωτούχων ενώσεων από υδατικά διαλύματα. Οι ρητίνες XAD-4 και XAD-16 είναι μη πολικές και χρησιμοποιούνται σε ευαίσθητες αναλυτικές διαδικασίες για τον εντοπισμό και αναγνώριση ναρκωτικών και οργανικών περιβαλλοντικών ρύπων. Η ρητίνη XAD-7HP είναι ενδιάμεσης πολικότητας και έχει τη δυνατότητα προσρόφησης υδρόφοβων συστατικών από το νερό και υδρόφιλων συστατικών από άνυδρα συστήματα. Χρησιμοποιείται στον καθαρισμό ενζύμων και πεπτιδίων ενώ προσροφά φαινόλες από το νερό. Τα φυσικοχημικά

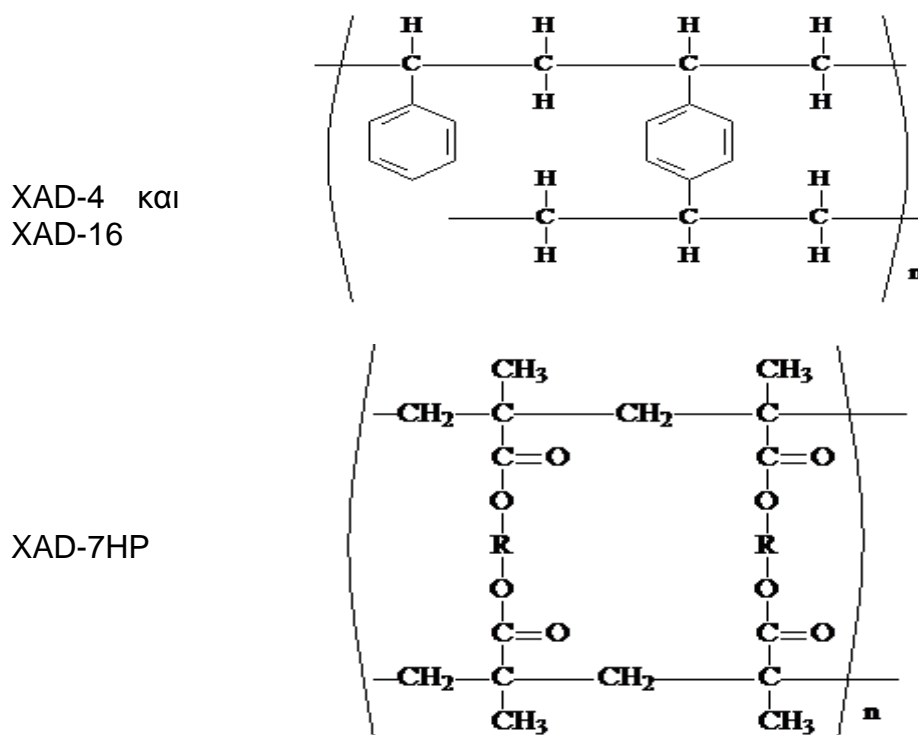
χαρακτηριστικά των ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP συγκεντρώνονται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6.** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP

Ρητίνη	ΧΑD-4	ΧΑD-16	ΧΑD-7HP
Συμπολυμερισμός	Στυρολίου-διβινυλβενζολίου	Στυρολίου-διβινυλβενζολίου	Ακρυλαμιδίου-διβινυλβενζολίου
Ειδική επιφάνεια, $m^2g^{-1}$	750	450	750
Πορώδες, $cm\ cm^{-3}$	0.65-0.70	0.55	0.58-0.63
Ολική πυκνότητα, $g.\ cm^{-3}$	0.62-0.63	0.62	0.61
Μέγεθος κόκκων mm	0.3-1.2	0.3-1.2	0.3-1.2

### 7.5 Χημική δομή ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP

Η χημική δομή των ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP φαίνεται στην Εικόνα 6

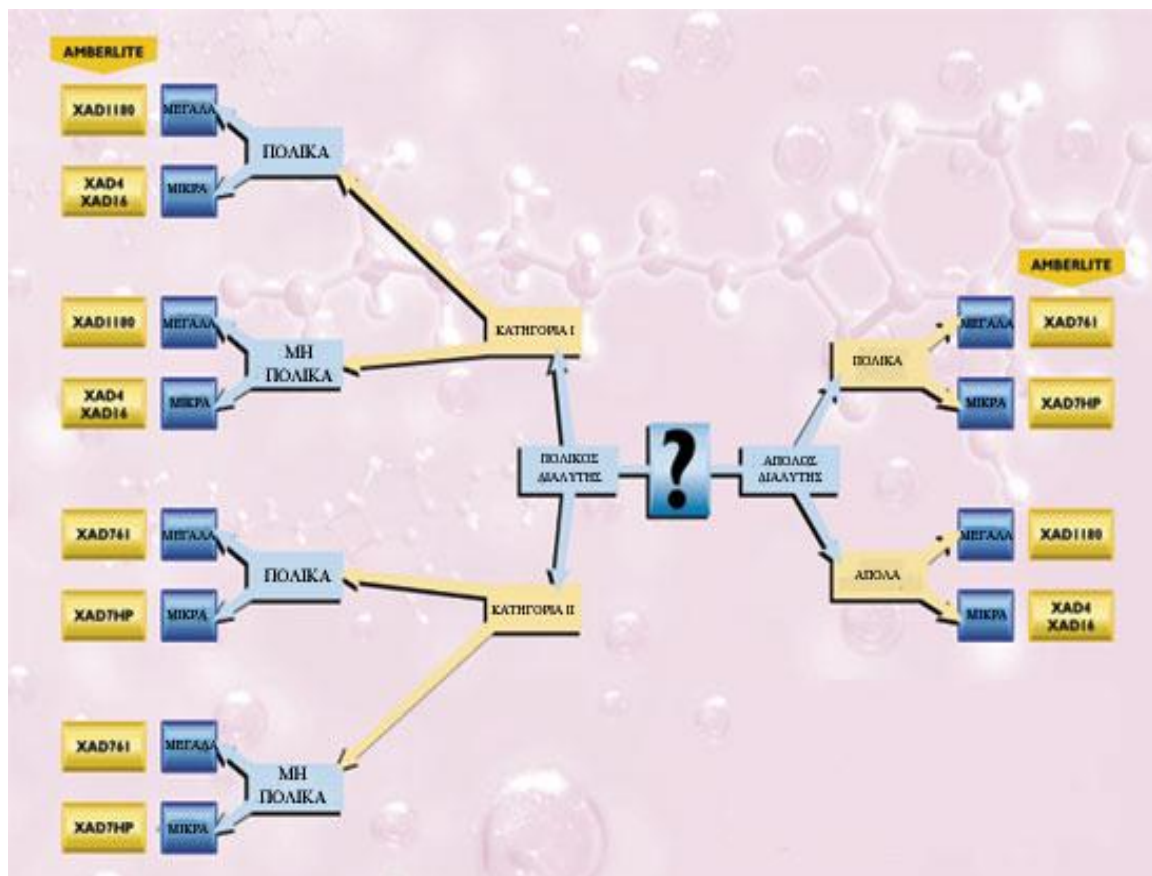


**Εικόνα 6.** Χημική δομή των ρητινών ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP

## 7.6 Τεχνικές χρήσης ρητινών προσρόφησης

Οι συνήθειες τεχνικές χρήσης των ρητινών προσροφήσεως είναι η τεχνική λουτρού και η τεχνική στήλης. Κατά την τεχνική λουτρού, η ρητίνη τοποθετείται μαζί με το διάλυμα του δείγματος μέσα σε υποδοχεία και αναταράσσεται, μέχρις ότου αποκατασταθεί ισορροπία. Στη συνέχεια η ρητίνη απομακρύνεται με διήθηση, απόχυση ή φυγοκέντριση και αναγεννάται για επαναχρησιμοποίηση. Πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής αποτελεί η απλότητά της.

Κατά την τεχνική στήλης, η ρητίνη τοποθετείται σε κατακόρυφο σωλήνα με πορώδη πυθμένα και τα υγρά τροφοδοτήσεως και αναγεννήσεως της στήλης ρέουν από πάνω προς τα κάτω. Στην τεχνική στήλης συμβαίνουν πολυάριθμες τεχνικές λουτρού στα επάλληλα στρώματα της ρητίνης και έτσι η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης μπορεί να καταστεί ποσοτική, αρκεί να μην υπερβούμε την προσροφητική χωρητικότητα της στήλης. Τα στάδια διαχωρισμού με την τεχνική στήλης είναι τα εξής Εικόνα 7 :



**Εικόνα 7.** Σχηματική αναπαράσταση τρόπου επιλογής ρητίνης. Κατηγορία I: αρωματικές ενώσεις, ενώσεις με άζωτο, θείο, χλώριο και βρώμιο, Κατηγορία II: ενώσεις με κορεσμένους δεσμούς C-C, πρωτεΐνες, πεπτιδία, αμινοξέα και βιταμίνες.

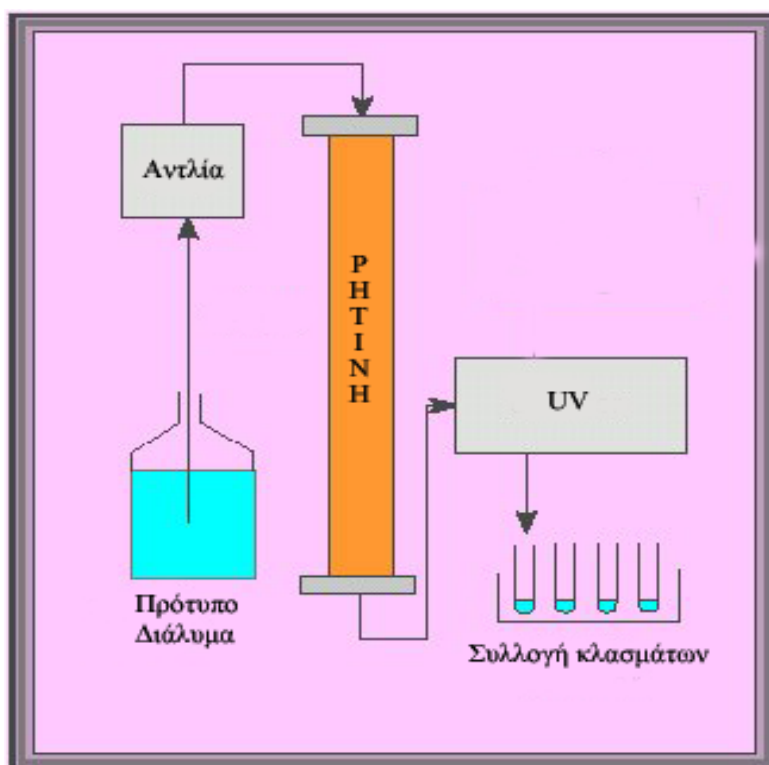
1) Διαβίβαση του διαλύματος μέσα από τη στήλη, οπότε οι χημικές ουσίες προσροφούνται από την ρητίνη της στήλης ενώ οι ουσίες που δεν προσροφούνται διέρχονται από τη στήλη, 2) Έκλουση της στήλης με κατάλληλο διαλύτη για τη σταδιακή εκτόπιση των προσροφημένων ουσιών και την έξοδό τους από τη στήλη σε ξεχωριστά κατά το δυνατόν κλάσματα.

### 7.7 Προετοιμασία ρητινών

Όταν παραλαμβάνονται είναι εμποτισμένες σε νερό που περιέχει NaCl και Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ώστε να μην αναπτυχθούν βακτήρια. Για να απομακρυνθούν τα άλατα αυτά και να γίνει καθαρισμός πριν από την χρήση, κάθε ρητίνη εκχυλίστηκε με ακετόνη για 8 h και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό στους 24°C. Στο πείραμά μας, 300 ml ρητίνης XAD-4 χρησιμοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν στη διαδικασία καθαρισμού και ενεργοποίησης τους.

### 7.8 Πείραμα προσρόφησης με τεχνική στήλης

Οι διαστάσεις της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 4.5 cmx 30 cm και πληρώθηκε με ρητίνη XAD-4.



**Εικόνα 8.** Απεικόνιση της διάταξης για την προσρόφηση με τεχνική στήλης

100 ml συμπυκνωμένου χυμού ροδιού, διαλύονται σε απιονισμένο νερό μέχρι όγκου 1 lit. Το διάλυμα διέρχεται από τη σήλη, με τη βοήθεια αντλίας, με ρυθμό 8 ml/min. Κατόπιν η ρητίνη εκπλένεται με όγκο νερού 4 lit. Για την παραλαβή των δραστικών συστατικών (μίγμα πολυφαινολών από φαινολικά οξέα, ανθοκυάνες κλπ), εκπλένουμε τη ρητίνη με 1 lit αιθανόλης 96%. Με τον τρόπο αυτό παραλαμβάνεται στο τέλος αιθανολικό διάλυμα, πλούσιο σε φαινολικά παράγωγα.

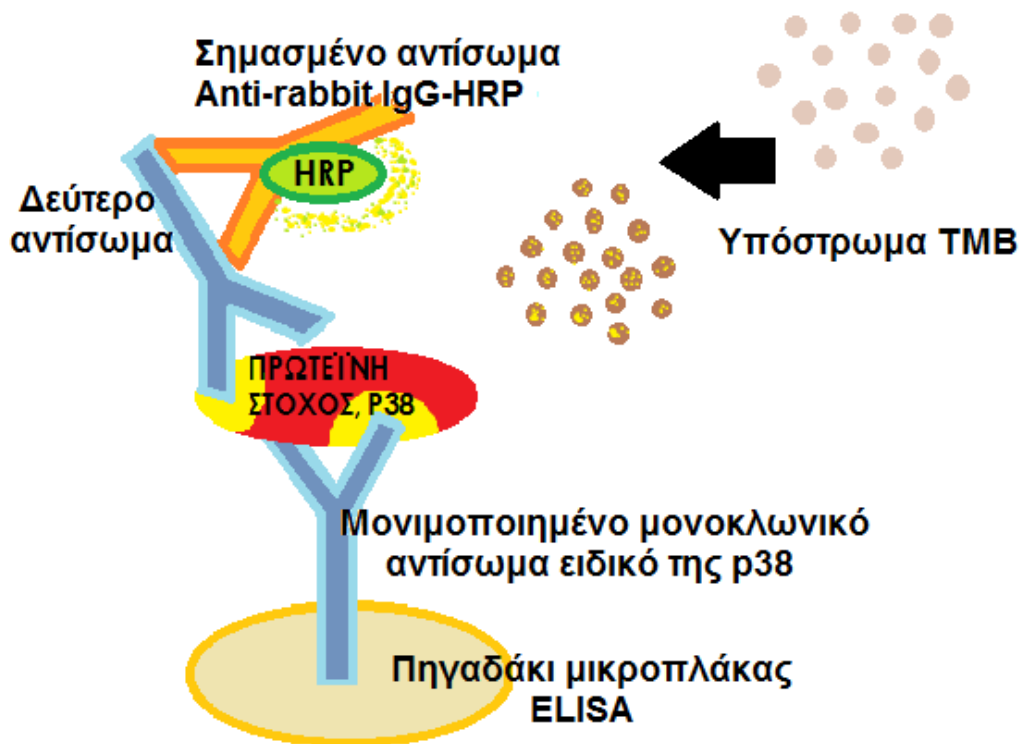
Το τελικό διάλυμα συμπυκνώνεται και ξηραίνεται μέχρι στερεού υπολείμματος. Το τελικό λαμβανόμενο βάρος του εκχυλίσματος σε ξηρή κατάσταση είναι 0,9 gr.

## **8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ p38 ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

### **8.1 Διαδικασία ανίχνευσης**

Για την ανίχνευση της p38 χρησιμοποιήθηκε kit της BiosourceInt.Inc. p38MAPK (pTrY180/182), το οποίο βασίζεται στη μέθοδο της sandwichELISA. Προς τον σκοπό αυτό ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την p38 (μη εξαρτώμενο από την κατάσταση φωσφορυλίωσης), έχει μονιμοποιηθεί στα πηγαδάκια μικροπλάκας 96 θέσεων, η οποία παρέχεται με το kit. Μάρτυρες γνωστής συγκέντρωσης p38 καθώς και τα άγνωστα δείγματα με πιπέτα τοποθετούνται στα πηγαδάκια. Μετά την πρώτη επώαση το αντιγόνο p38 δεσμεύεται στο μονιμοποιημένο αντίσωμα. Στη συνέχεια πλένονται και προσθίθεται διάλυμα με το δεύτερο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό για την φωσφορυλιωμένη p38 στη θρεονίνη 180 και 182. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης επώασης, το δεύτερο αντίσωμα συνδέεται με το καθηλωμένο, πλέον, σύμπλοκο p38-πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του αντισώματος και προσθίθεται ένα τρίτο αντίσωμα που έχει επισημανθεί με HRP(anti-rabbitIgG-HRP). Το τελευταίο αντίσωμα προσκολλάται στο δεύτερο αντίσωμα κατά τη διάρκεια μίας τρίτης επώασης. Με πλύσιμο αφαιρείται η περίσσεια και προσθίθεται το διάλυμα του υποστρώματος το οποίο ενεργοποιείται με τη σύνδεσή του στο ένζυμο και παράγει χρώμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 .





**Εικόνα 9.** Η Αρχή της μεθόδου sandwich ELISA

Η ένταση του χρώματος που προκύπτει είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της p38 MAPK (pTrY180/182) στα προς εξέταση δείγματα. Το ποσοτικό αποτέλεσμα της συγκέντρωσης προσδιορίζεται από την καμπύλη συγκέντρωσης των γνωστών μαρτύρων.

## **8.2 Διαδικασία εξαγωγής πρωτεϊνών από τα κύτταρα.**

### *A. Πρωτόκολλο εξαγωγής*

1. Συλλέγονται τα κύτταρα σε PBS με φυγοκέντρηση.
2. Πλένονται 2 φορές με παγωμένο PBS.
3. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και κρατάμε το pellet των κυττάρων (Σε αυτό το σημείο είναι δυνατόν εφόσον θέλουμε να το παγώσουμε στους -80°C και να συνεχισθεί η λύση σε άλλη ημερομηνία).
4. Τα κύτταρα λύνονται επί 30 min στο buffer εξαγωγής, που είχε ήδη παρασκευασθεί, μέσα σε πάγο και με ανακινούμε σε διαστήματα ανά 10 min.

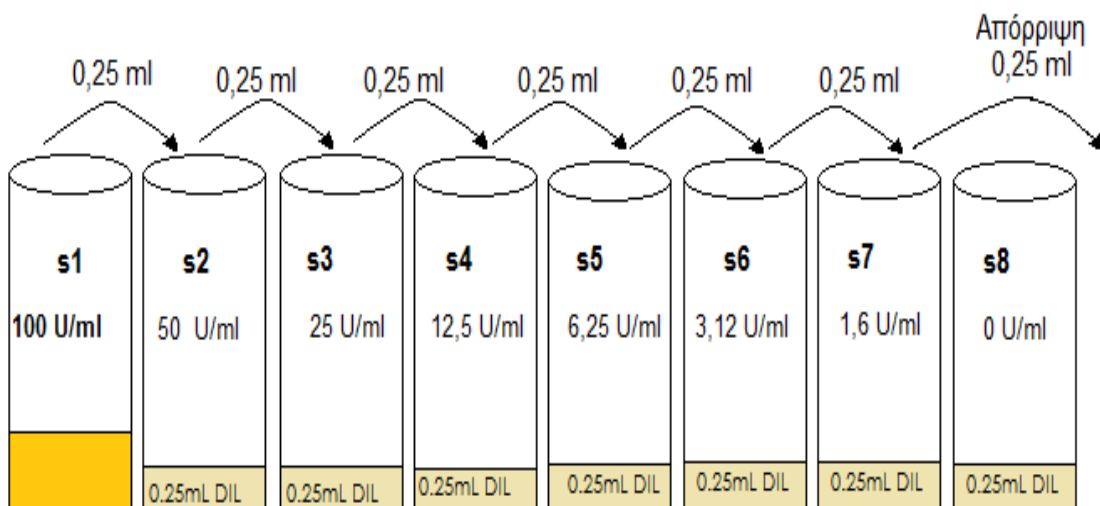
5. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδια μικροφυγοκέντρου και φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm 10 min στους 4 °C.
6. Μεταφέρεται το καθαρό λυμένο προϊόν σε νέα φιαλίδια και το ψύχεται στους -80 °C μέχρι τη χρήση.

### 8.3 Παρασκευή αντιδραστηρίων

#### A. Ανασύσταση και διάλυση των γνωστών μαρτύρων

Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή παρασκευάστηκαν από ανθρώπινη καθαρισμένη ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη ολόκληρου μήκους, η οποία φωσφορυλιώθηκε από την MKK6. Ορίζεται ως μία μονάδα μάρτυρα η ποσότητα της p38 MAPK (pTrY180/182) η οποία ισοδυναμεί με αυτή που προέρχεται από 40 pgp38 MAPK, που προέκυψε από την φωσφορυλίωση της MKK6.

- Δείγματα :Αραίωση 1:10 με samplediluent
- Μάρτυρες: Ανασύσταση του λυοφιλιωμένου μάρτυρα με standarddiluentbufferέως τελική σύσταση 100 Units/mL. Στη συνέχεια προβαίνουμε σε σειριακή αραίωση (βλέπε Εικόνα 10). Αρχικά εισάγονται 0,25 mL από το diluentbuffer στα υπόλοιπα επτά φιαλίδια. Από το πρώτο φιαλίδιο μεταφέρονται στο δεύτερο 0,25 mL και στη συνέχεια από το δεύτερο μεταφέρονται στο τρίτο 0,25 mL και ούτω καθεξής. Το τελευταίο το απορρίπτεται καθότι ο μηδενικός μάρτυρας περιέχει μόνο diluentbuffer.



#### ΣΕΙΡΙΑΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ

**Εικόνα 10.** Σειριακή αραίωση των μαρτύρων για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς.

Με τον τρόπο αυτό παράγονται τα παρακάτω standards (γνωστοί μάρτυρες), όπως φαίνονται στον Πίνακα 10:

**Πίνακας 10.** Συγκεντρώσεις των μαρτύρων (standards)

Standards	1	2	3	4	5	6	7	8
Συγκέντρωση Units/mL	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6	0

### ***B. Διάλυση αντισώματος σήμανσης***

Το anti-rabbitIgG-HRP 100xδιάλυμα αποτελείται από 50% γλυκερόλη και είναι ιξώδες. Για τη διασφάλιση της ακρίβειας της διάλυσης, αφέθηκε το διάλυμα να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστικού Οίκου για τα 2 strips της μικροπλάκας αναμείχθηκαν 20 μl από το παραπάνω διάλυμα του αντισώματος με 2ml από το HRPdiluent με ελαφρά ανάδευση.

### ***Γ. Διάλυση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (washbuffer).***

Το 25x συγκεντρωμένο διάλυμα αφέθηκε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και ανακινήθηκε ελαφρά για την πλήρη διάλυση του χλωριούχου νατρίου. Το λαμβανόμενο διάλυμα αραιώθηκε για κάθε όγκο του διαλύματος με 24 όγκους απεσταγμένο νερό. Συγκεκριμένα αραιώθηκαν 50 ml διαλύματος 25x, σε 1.2l απεσταγμένο νερό.

## **9.ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

### **9.1. *In vitro* cell lines screening project/ (Υπολογισμός ανάπτυξης των κυττάρων sbcl1)**

Το in vitro cell line screening project (IVGLSP) είναι ένα εξειδικευμένο πρόγραμμα που παρέχει άμεση υποστήριξη του DTP αντικαρκινικού προγράμματος ανακάλυψης φαρμάκων. Το IVGLS λειτουργεί από το 1990 και απαιτήθηκαν 5 έτη ώστε να αναπτυχθεί. Αυτό το πρόγραμμα σχεδιάστηκε έτσι, ώστε να μπορούν αναλυθούν και να διαχωρθούν περισσότερα από 3000

συστατικά ανά έτος, με πιθανή αντικαρκινική δράση. Στη διαδικασία του screen αυτού χρησιμοποιούνται 60 διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές σειρές, όπως η λευχαιμία, το μελάνωμα, καρκίνοι του πνεύμονα, του εγκεφάλου, της μήτρας του μαστού, του προστάτη και των νεφρών. Σκοπός βέβαια είναι η περαιτέρω αξιολόγηση δειγμάτων με νέες χημικές αντικαρκινικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα, προβάλλοντας με τον τρόπο αυτό την επιλεγμένη αναστολή της ανάπτυξης ή τον κυτταρικό θάνατο στις προκαθορισμένες κυτταρικές σειρές. Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1 αναπτύχθηκε σε RPMI 1640, η οποία περιείχε 5% ορό fetalBovine και 2mM-glutamine. Για το τυπικό πείραμα screening, τα κύτταρα επώασθηκαν σε 96άρα πλάκα των 100 μl σε συγκεντρώσεις μεταξύ 5000-40000 κύτταρα ανά πηγαδάκι. Στη συνέχεια η πλάκα επώασθηκε με συνθήκες: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% αέρα και 100% υγρασία επί 24 h χωρίς την προσθήκη του συστατικού-φάρμακο που πρόκειται ελέγξουμε. Μετά από 24 h δύο μέρη από την κυτταρική σειρά μονιμοποιούνται *insitu* με TCA, την αντιπροσωπευτική μέτρηση του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού (Tz) τη στιγμή της προσθήκης του φαρμάκου.

Το πειραματικό φάρμακο διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξίδιο 2X των τελικών συγκεντρώσεων, τι οποίες επιθυμούμε και τα ψύχονται μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια, προστίθεται στα 96 πηγαδάκια, που περιέχουν ήδη 100μl του μέσου, το πιθανό φάρμακο(100μl), αρχίζοντας από 2X στην επιθυμητή συγκέντρωση 1X.

Μετά την πρόσθεση των φαρμάκων, επωάζονται οι πλάκες για 24 και 48 h στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και 100% σχετική υγρασία. Για τα προσκολλημένα κύτταρα η μέθοδος καθορίζεται μετά την πρόσθεση παγωμένου TCA. Μονιμοποιούνται τα κύτταρα *insitu* με ήπια προσθήκη 50 μl παγωμένου 50%(w/v) TCA (τελική συγκέντρωση 10% TCA) και επωάζονται για 60 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι πλάκες πλένονται πέντε φορές. Στη συνέχεια προσθέτουμε στα πηγαδάκια 100μl διαλύματος sulforhodamineB (χρωστική SRB) 0,4%(w/v) σε 1% οξικό οξύ. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Η αδέσμευτη χρωστική απομακρύνεται με πλύση (πέντε φορές) με 1% οξικό οξύ. Η δεσμευμένη χρωστική διαλυτοποιείται προσθέτοντας 10mM trizma base, και η απορροφητικότητα μετράται στο λ<sub>max</sub>= 515 nm

Οι υπολογισμοί της ανάπτυξης των κυττάρων γίνονται με βάση την μείωση της συνολικής πρωτεΐνης (όπου προσκολλάται η χρωστική) σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα αναφοράς ή με την τιμή σε χρόνο  $t=0$  ( $T_z$ ). Ολική αναστολή της ανάπτυξης θεωρούμε όταν η τιμή  $T_z$  είναι περίπου ίση με την τιμή των κυττάρων παρουσία του πιθανού φαρμάκου ( $T_i$ ).

## **9.2 Υπολογισμός αριθμητικής ανάπτυξης των κυττάρων A375 και M5**

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μελανώματος, η A375 και η M5. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους  $37^\circ\text{C}$  και σε ατμόσφαιρα  $\text{CO}_2$  5% (v/v) σε ειδικές φλάσκες καλλιέργειας ή τριβλία με την κατάλληλη επίστρωση. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό RPMI-1640 παρουσία 10% (v/v) ορού [fetal bovine serum (FBS)] και γενταμικίνη (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Η αλλαγή του θρεπτικού καλλιέργειας γινόταν κάθε δύο μέρες. Η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες καλλιέργειας γινόταν με ήπια ενζυμική κατεργασία με τρυψίνη [0.25% τρυψίνη σε PBS 0.1% (w/v)]  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  για 5 λεπτά στους  $37^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση των κυττάρων για 10 λεπτά στα 1500 rpm, επαναδιάλυσή τους σε 1 ml θρεπτικού και με την κατάλληλη αραιώση, καλλιέργειά τους σε νέες φλάσκες.

Η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο CyQUANT cell proliferation Assay Kit (Molecular Probes) σύμφωνα με τις οδηγίες του καστευαστή. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων παρουσία 10% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια σε θρεπτικό απουσία ορού για 24 ώρες πριν τη χορήγηση των παραγόντων. Μετά τη χορήγηση των παραγόντων τα κύτταρα επώαστηκαν σε θρεπτικό χωρίς FBS για 48 ώρες μαζί με τους παράγοντες. Στη συνέχεια ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μετρήθηκε σε φλορόμετρο.

## **10. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p38 $\alpha$ .**

Για την ανίχνευση της αναστολής ή ενεργοποίησης της δράσης της p38 $\alpha$ , χρησιμοποιούμε το kit της MBL international με κωδικό CY-1177 που στηρίζεται σε χρωμογονική μέθοδο. Το cyclexkit είναι ένα ολοκληρωμένο CE/IVD kit γρήγορο

και ευαίσθητο για την αξιολόγηση των αναστολέων της p38. Χρησιμοποιείται πολυκλωνικό αντίσωμα που έχει δείξει ότι αναγνωρίζει την φωσφο-θρεονίνη 71 στο ATF-2 το οποίο φωσφορυλιώνεται επαρκώς από την p38.

Πρόκειται για μία ημιποσοτική μέθοδο. Η μικροπλάκα φέρει επίστρωση με ανασυνδιασμένη ATF-2 πρωτεΐνη. Το αντίσωμα ανίχνευσης αναγνωρίζει ειδικά μόνο τη φωσφορυλιωμένη μορφή στον ATF2. Τα δείγματα αραιώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης και μεταφέρονται στην πλάκα ώστε να συνδεθούν με το υπόστρωμα ύστερα από εισαγωγή μαγνησίου και ATP.

Αρχικά τα δείγματα ουσιών διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης που παρέχεται από την εταιρεία και επίσης διαλύουμε τις ουσίες κοντρόλ όπως δείχνει ο παρακάτω Πίνακας 9.

**Πίνακας 9.** Ποσότητες αντιδραστηρίων που προστέθηκαν στα δείγματα

Αντιδραστήρια	Δείγματα	Διάλυμα αναφοράς (κοντρόλ)	Διάλυμα αναστολή (κοντρολ)
Kinase reaction buffer	80μl	80 μl	80 μl
10xαναστολέας (δείγμα)	10μl	-	-
Διαλύτης	-	10 μl	-
10xSB 202190 (20μM)	-	-	10 μl
Θετικός μάρτυρας p38α	10 μl	10 μl	10 μl

**Πίνακας 10.** Τελικές συγκεντρώσεις των προς διερεύνηση ουσιών.

Ουσία	Τελική συγκέντρωση
Απόσταγμα ροδιού	150μg/ml
θεοφυλλίνη	1mM
Σαλικυλικό οξύ	20mM
Σαλικυλικό οξύ	5 mM
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	1mM
Δελφινιδίνη	150μg/ml
Καφεϊκό οξύ	10mM
SB202190	2μM

Σύμφωνα με τις παραπάνω αραιώσεις που απαιτούνται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων και επειδή έπρεπε οι χρησιμοποιούμενες ουσίες να αποκτήσουν τελικές συγκεντρώσεις ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα κυτταροκαλλιιεργιών, αλλά και αυτών που προτείνει η βιβλιογραφία, οδηγηθήκαμε σε τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν, όπως δίνονται στον Πίνακα 10.

### 10.1 Διαδικασία μεθόδου

Κατά το στάδιο αυτό του πειράματος έγιναν τα παρακάτω βήματα:

- Προστίθενται σε 9,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος για την p38α κινάση, που παρέχεται από τον κατασκευαστή του kit 0,5 ml ATP
- Αραιώνονται τα δείγματα, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα με το ρυθμιστικό διάλυμα κινάσης και προστίθενται 10ml από κάθε δείγμα στα πηγαδάκια εις διπλούν.
- Προστίθενται 10ml θετικού μάρτυρα
- Γίνεται η έναρξη της αντίδρασης προσθέτοντας 90ml από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, που παρέχεται από το kit, και επωάζονται για 60 min στους 30 °C.
- Κατόπιν με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης πλένονται πέντε φορές.
- Προσθέτουμε 100ml από το αντι-φωσφο-ATF-2 αντίσωμα και επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναλαμβάνεται η πλύση, όπως παραπάνω
- Προστίθενται 100ml HRP-αντίσωμα
- Επαναλαμβάνεται η πλύση, όπως παραπάνω
- Προστίθενται 100ml από το διάλυμα του υποστρώματος και επωάζονται για 15 λεπτά.
- Διακόπτεται η αντίδραση και προστίθενται 100ml από το διάλυμα οξέος και μετράται το αποτέλεσμα σε φωτόμετρο σε  $\lambda_{max} = 450 \text{ nm}$ .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### **11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΡΟΔΙΟΥ -Επιλογή ρητίνης.**

Λαμβάνοντας υπόψη τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ρητινών καταλήξαμε στους τύπους ΧΑD-4, ΧΑD-16 και ΧΑD-7HP, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ελέγχους υψηλής απόδοσης, για την δέσμευση πολυφαινολών από το χυμό του ροδιού. Η επιλογή της ρητίνης βασίζεται στον υπολογισμό της προσροφητικής της ικανότητας για συγκεκριμένη ουσία ή ουσίες. Η προσροφητική ικανότητα υπολογίστηκε με τα πειράματα ισορροπίας προσρόφησης (equilibrium models) και τις ισόθερμες καμπύλες. Η συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας ήταν εκείνη που στο διάλυμα έφθασε σε δυναμική ισορροπία με τη συγκέντρωσή της στο προσροφητικό μέσο.

Η ισόθερμη καμπύλη υπολογίστηκε με βάση το πλέον διαδεδομένο μαθηματικό μοντέλο του Freundlich, που περιγράφει την κατάσταση ισορροπίας του φαινομένου της προσρόφησης. Η επιλογή έγινε επειδή ήταν δυνατή η σύγκριση της προσροφητικής ικανότητας διαφόρων ρητινών με ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η μαθηματική εξίσωση αυτού του μοντέλου είναι η εξής:

$$q_s = K_F C_s^{b_F} \quad (1)$$

όπου  $q_s$  (mg/g) είναι η συγκέντρωση της ουσίας που έχει προσροφηθεί στο σημείο ισορροπίας,  $C_s$  (mg/L) είναι η συγκέντρωση της ουσίας που βρίσκεται στο διάλυμα,  $K_F$  και  $b_F$  είναι εξαρτώμενες από την θερμοκρασία παράμετροι κάθε συστήματος προσροφήσεως. Οι σταθερές  $K_F$  και  $b_F$  προσδιορίζουν την χωρητικότητα και την ένταση της προσροφητικής διαδικασίας και όσο υψηλότερη τιμή έχουν τόσο μεγαλύτερη είναι η προσροφητική ικανότητα της



ρητίνης. Στην πράξη η ισόθερμη Freundlich εφαρμόζεται με την λογαριθμική της μορφή:

$$\log q_s = \log K_F + b_F \log C_s \quad (2)$$

Σχεδιάζοντας την γραφική απεικόνιση της εξίσωσης σε λογαριθμικούς άξονες υπολογίστηκαν οι σταθερές  $K_F$  και  $b_F$  από το σημείο τομής και την κλίση της ευθείας. Το  $b_F$  ισούται με  $1/n$ , όπου  $n$  είναι σταθερά της οποίας η τιμή πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 1 για να είναι κατάλληλη η ρητίνη για προσρόφηση της υπό εξέταση ουσίας, ενώ όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τόσο μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα εμφανίζει η ρητίνη.

## **12.Sbcl1 ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ**

### **12.1 Επίδραση των πολυφαινολών στην κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1.**

Όπως προαναφέρθηκε, οι φυτικής προέλευσης πολυφαινόλες, φαίνονται να έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές<sup>112,113</sup>. Μάλιστα, δίαιτες πλούσιες σε πολυφαινόλες προτείνονται για την πρόληψη του καρκίνου<sup>114,115</sup>. Τελευταία, η έρευνα έδειξε ότι κατά την χημειοθεραπεία μειώνονται τα ποσοστά πολυφαινολικών ενώσεων στο πλάσμα και έτσι μειώνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνο του εντέρου<sup>116</sup>. Αυτό συμβαίνει επειδή οι διπλοί δεσμοί των πολυφαινολικών ενώσεων τις καθιστούν διπλά προστατευτικές για το κύτταρο, καθώς τους δίνουν την ικανότητα να προσλάβουν τις ελεύθερες ρίζες<sup>117</sup> και να παρεμποδίσουν τυχόν βλάβες στο DNA<sup>118</sup> (αντιδρούν με τις ρίζες DNA-OH\*) ή να δώσουν άτομα υδρογόνου και να επιδιορθώσουν τις προκληθείσες βλάβες.

Επίσης, η γλυκοσίδη της κυανιδίνης που βρίσκεται στο χυμό του ροδιού αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων του πνεύμονα<sup>119</sup>, καθώς και εμποδίζει το μετασχηματισμό των JB6 επιδερμικών κυττάρων ποντικών σε νεοπλασματικά<sup>120</sup>. Την παραπάνω δράση στα JB6 κύτταρα έχει και η δελφινιδίνη, μία ανθοκυανιδίνη που επίσης περιέχεται στο χυμό του ροδιού και η οποία έχει δείξει ότι αναστέλλει την τον πολλαπλασιασμό στα MCF-10 κύτταρα μαστού<sup>121</sup>.

Η επίδραση πολλών ολικών εκχυλίσματων καρπών, που περιέχουν πολυφαινόλες, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Παρόλα αυτά, το εκχύλισμα του ροδιού έχει αναφορές μόνο στον καρκίνο του προστάτη και στον καρκίνο του πνεύμονα<sup>122,119</sup>.

Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν τα παρακάτω πείραμα με στόχο να λάβουμε βασικές πληροφορίες σχετικά με τις αντικαρκινικές ή μη ιδιότητες των πολυφαινολών του ροδιού. Αρχικά, επειδή δεν μελετήθηκε μέχρι σήμερα η επίδραση του εκχυλίσματος του ροδιού στο μελάνωμα η έρευνα στράφηκε προς αυτή την κατεύθυνση. Δεύτερον, στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα ροδιού, τα οποία απομονώθηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε και όχι ως ολικός χυμός.

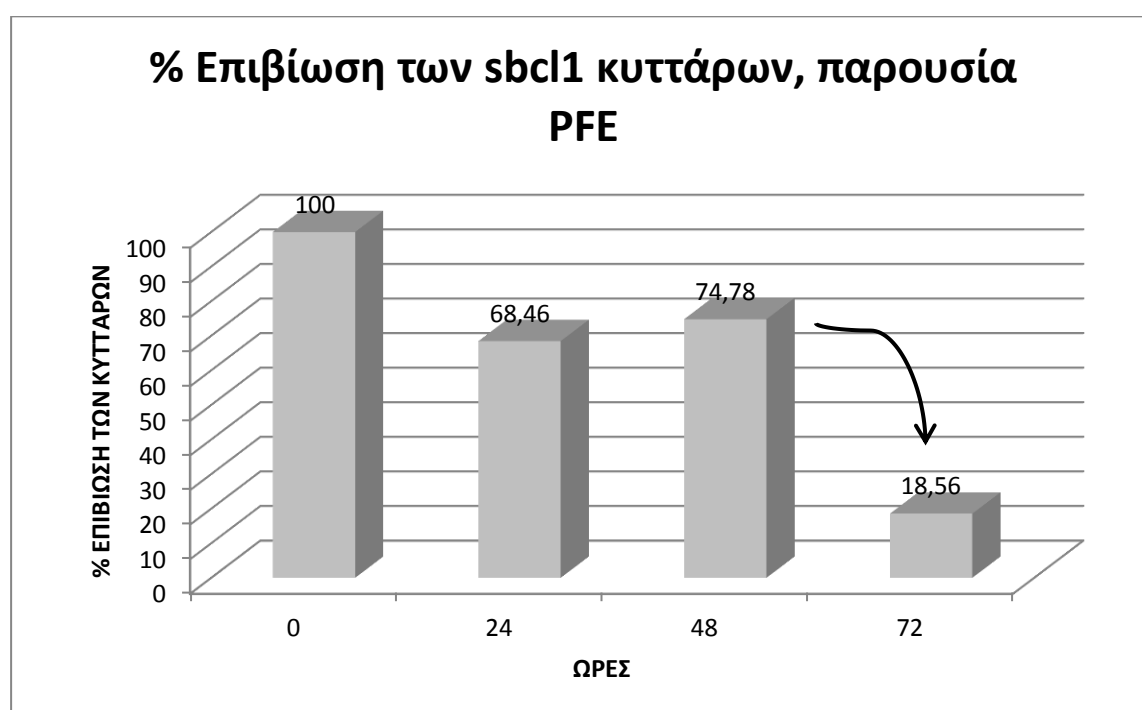
Η κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1, που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία<sup>123</sup> χαρακτηρίζεται από χρωμοσώματα με μακριά τελομερή, τα οποία καθιστούν τα κύτταρα αυτής της σειράς πιο ανθεκτικά. Η επιλογή έγινε με το σκεπτικό ότι αυτή η σειρά είναι μία αρκετά ανθεκτική σειρά μελανώματος και επιδιώκεται η σύγκριση με άλλες πιο γνωστές κυτταρικές σειρές.

Οι συγκεντρώσεις του πολυφαινολικού εκχυλίσματος (PFE) καθορίστηκαν με βάση τις συγκεντρώσεις του ροδιού που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως στα κύτταρα του πνεύμονα<sup>119</sup> και PC3 κύτταρα προστάτη<sup>122</sup>, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Τα ποσοστά επιβίωσης θεωρήθηκαν 100% ως προς τα κύτταρα αναφοράς, δηλαδή των κυττάρων χωρίς καμία προσθήκη ουσίας ή αναστολέα και η αναστολή από την διαφορά μεταξύ 100 και ποσοστού επιβίωσης (100-ποσοστό επιβίωσης).

Στον Πίνακα 11 και το Διάγραμμα 1 φαίνεται ότι η επιβίωση των κυττάρων σε σχέση με το μάρτυρα ανέρχεται σε 68,46% στις 24 h, 74,78% στις 42 h και 18,56 στις 72 h.

**Πίνακας 11.**Ποσοστό επιβίωσης και αναστολής της ανάπτυξης στα sbcl1 κύτταρα μελανώματος υπό την επίδραση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/mL.

% Αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος (PFE)		
h	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
24	68,4%	31,5 %
48	74,8%	25,2%
72	18,6%	81,4%



**Διάγραμμα 1.** Χωρογραφική απόδοση επί τοις εκατό επιβίωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ), παρουσία PFE.

Επίσης, στον Πίνακα 11 φαίνεται πως η δράση των πολυφαινολών αποκτά μέγιστη τιμή στις 72h. Αυτή η παράταση της δράσης τους αποδίδεται πιθανόν στην αντίσταση του κυττάρου να επηρεαστεί από το ερέθισμα, λόγω της ανθεκτικότητας την οποία του προσδίδουν τα μακρά τελομερή. Όμως την υπόθεση αυτή δεν μπορούμε να διασταυρώσουμε με βιβλιογραφικές αναφορές, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για τα sbcl1 κύτταρα.

Παρατηρείται στο Διάγραμμα 1 ότι στις 72 h υπάρχει έντονη μείωση της επιβίωσης σε στάθμη εμπιστοσύνης 99,9% με  $p < 0,001$  (Πίνακας 12). Από τις 24h στις 48h παρατηρείται μία αύξηση της ανάπτυξης των κυττάρων, αλλά και στις δύο αυτές περιπτώσεις η μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων είναι πολύ μικρότερη αυτής των 72h. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει λόγω διαφορετικής χρονικής ενεργοποίησης των μηχανισμών που προάγουν ή αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό.

**Πίνακας 12.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών στις 72h των κυττάρων αναφοράς (P) και των κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού (T)

Paired t test P-T						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
P	6	2,274667	0,0173141	0,0424107	2,230159	2,319174
T	6	0,422333	0,020495	0,0502023	0,3696493	0,4750174
diff	6	1,852333	0,0320704	0,0785561	1,769894	1,934773
Mean (diff) = mean (P-T)				t= 57,7583		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">           Ha: mean(diff) != 0            Pr(  T   &gt;   t  ) = 0,0000         </div>		

Επιπλέον, το ποσοστό των κυττάρων στις 72 h υπό την επίδραση των πολυφαινολών είναι σχεδόν ίσο με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που είχαμε  $t=0$ , μιας και όπως φαίνεται στον Πίνακα 13 δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο απόλυτων τιμών (ολική αναστολή).

**Πίνακας 13.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης του αριθμού των κυττάρων σε χρόνο  $t=0$  (A) και των κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού στις 72h (T)

Paired t test A-T						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A	6	0,4776667	0,0105662	0,0258818	0,4505054	0,5048279
T	6	0,422333	0,020495	0,0502023	0,3696493	0,4750174
diff	6	0,0553333	0,0232446	0,0569374	-	0,1150855
Mean (diff) = mean (A-T)				t= 2,3805		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">           Ha: mean(diff) != 0            Pr(  T   &gt;   t  ) = 0,0631         </div>		

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν και με την επίδραση του ολικού εκχυλίσματος ροδιού σε άλλα κυτταρικά συστήματα<sup>119,122</sup>.

Επιπρόσθετα, παρατηρούμε και μείωση της επίδρασης του ροδιού σε ποσοστό 6,3% μεταξύ των 24 και 48 ωρών. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετική χρονική ενεργοποίηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο, καθώς τέτοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με άλλη πολυφαινολική ουσία το EGCG σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές<sup>125</sup>.

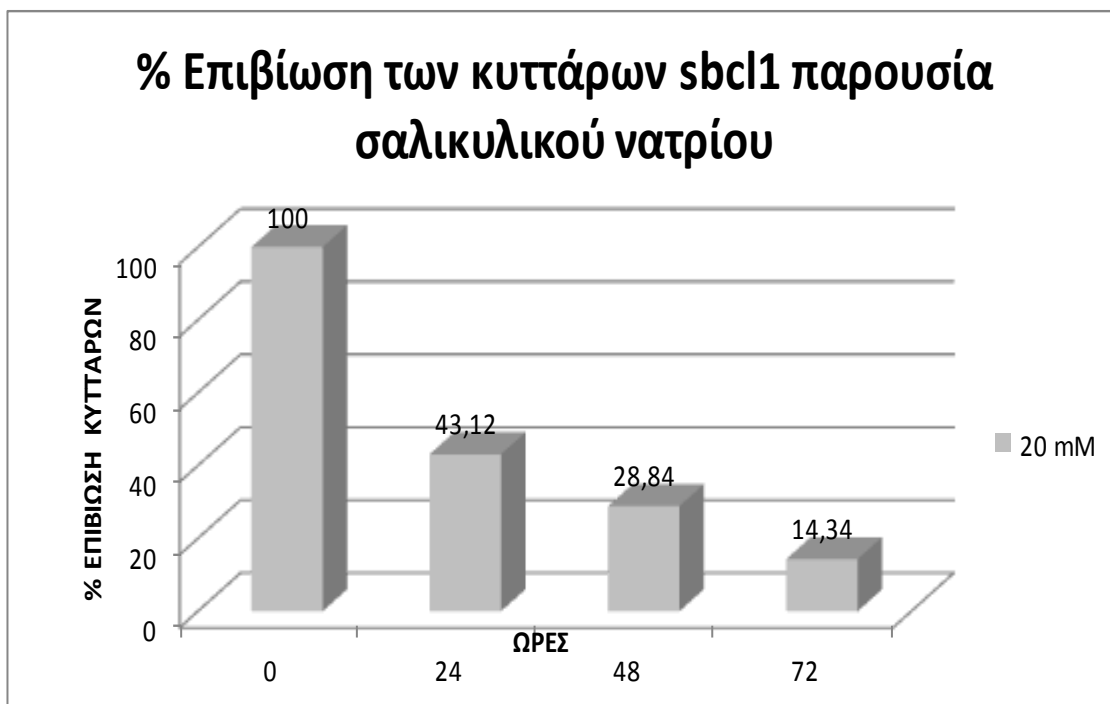
## 12.2 Αποτελέσματα δράσης του σαλικυλικού νατρίου στην κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1.

Στον Πίνακα 14 και το διάγραμμα 2 δίνονται τα αποτελέσματα του σαλικυλικού νατρίου στην κυτταρική σειρά μελανώματος sbcl1 για δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις 5mM και 20mM.

**Πίνακας 14.** Ποσοστό επιβίωσης και αναστολής της ανάπτυξης στα sbcl1 κύτταρα μελανώματος υπό την επίδραση σαλικυλικού νατρίου σε συγκεντρώσεις 20mM (SA20) και 5 mM(SA 5).

% Αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (κοντρόλ) παρουσία σαλικυλικού νατρίου		
h	SA 20mM	SA 5mM
24	43,1 % επιβίωση 56,9% αναστολή	73,5 % επιβίωση 26,5% αναστολή
48	28,8 % επιβίωση 79,1% αναστολή	62,4% επιβίωση 37,7% αναστολή
72	14,3 % επιβίωση 85,7% αναστολή	43,3 % επιβίωση 56,7% αναστολή

Παρατηρούμε ότι για τη συγκέντρωση του σαλικυλικού νατρίου 20mM(Διάγραμμα 2) η επιβίωση των κυττάρων φτάνει σε ποσοστό 43,12% στις 24 h με  $p < 0,001$  (Πίνακας 15 B-C), στις 48 h 28,84% με  $p < 0,001$  (Πίνακας 15 I-J) και 14,34% στις 72 h με  $p < 0,001$  (Πίνακας 16 P-Q).



**Διάγραμμα 2** . Χωρογραφική απόδοση επί τοις εκατό επιβίωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ) παρουσία 20 mM σαλικυλικού νατρίου.

Στον Πίνακα 16 (A-Q) φαίνεται πως στις 72 h η δράση του σαλικυλικού νατρίου 20mM είναι τόσο μεγάλη που ρίχνει στατιστικά σημαντικά  $p < 0,01$  το ποσοστό των κυττάρων σε σχέση με το  $t=0$ . Πρέπει όμως να παρατηρήσουμε ότι το σαλικυλικό νάτριο οδήγησε τα αρχικά κύτταρα σε θάνατο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβάλλεται πλέον η ανάγκη να προχωρήσει η έρευνα, ώστε να φανεί, αν είναι δυνατόν, μέσω ποίου μηχανισμού αναστέλλουν τα κύτταρα τον πολλαπλασιασμό τους, παρουσία του σαλικυλικού νατρίου και κατά πόσο αυτά τα μονοπάτια συνδέονται με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των πολυφαινολών. Αυτής της κατηγορίας πειράματα γίνονται κατά την εκπόνηση της διατριβής, ώστε να συγκρίνονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας με βιβλιογραφικά δεδομένα, ώστε να προσεγγίσουμε τον μηχανισμό.

**Πίνακας 15.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test των κυττάρων αναφοράς και των κυττάρων παρουσία σαλικυλικού νατρίου 20mM. Στις 24hόπου Β τα κύτταρα αναφοράς και C τα κύτταρα παρουσία σαλικυλικού νατρίου και στις 48h I τα κύτταρα αναφοράς και J τα κύτταρα υπό την παρουσία σαλικυλικού νατρίου αντίστοιχα.

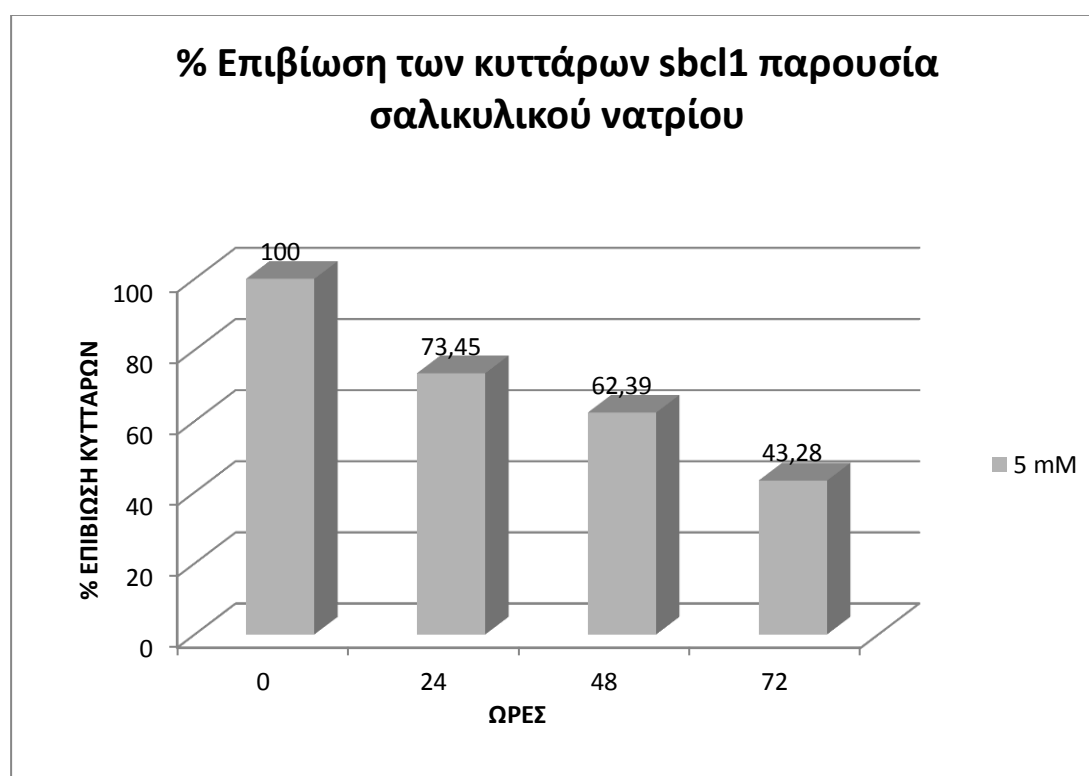
Paired t test B-C						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
B	6	0,9825	0,0547471	0,1341026	0,841768	1,123232
C	6	0,4236667	0,0416851	0,1021071	0,3165118	0,5308215
diff	6	0,5588333	0,0653409	0,1600518	0,3908693	0,7267974
Mean (diff) = mean (P-T)				t= 8,5526		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr( T  >  t ) = 0,0004						
Paired t test I-J						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
I	6	1,585667	0,0477093	0,1168635	1,463026	1,708307
J	6	0,3276667	0,0341806	0,0837249	0,2398027	0,4155306
diff	6	1,258	0,0478045	0,1170965	1,135115	1,380885
Mean (diff) = mean (I-J)				t= 26,3155		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr( T  >  t ) = 0,0000						

**Πίνακας 16.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test των κυττάρων αναφοράς (P), των κυττάρων σε t=0 (A) και των κυττάρων παρουσία σαλικυλικού νατρίου 20mM στις 72h (Q).

Paired t test P-Q						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
P	6	2,274667	0,0173141	0,0424107	2,230159	2,319174
Q	6	0,3263333	0,0264331	0,0647477	0,2583848	0,3942819
diff	6	1,948333	0,0339094	0,0830606	1,861167	2,0355
Mean (diff) = mean (P-Q)				t= 57,4571		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr( T  >  t ) = 0,0000						
Paired t test A-Q						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A	6	0,4776667	0,0105662	0,0258818	0,4505054	0,5048279
Q	6	0,3263333	0,0264331	0,0647477	0,2583848	0,3942819
diff	6	0,1513333	0,0275979	0,0676008	0,0803907	0,222276
Mean (diff) = mean (A-Q)				t= 5,4835		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr( T  >  t ) = 0,0028						

Για να ερμηνευθούν τα παραπάνω αποτελέσματα πρέπει να δεχθούμε ότι πρέπει να συμμετέχει στη διαδικασία, η p38 MAPκινάση, η οποία είναι ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό ή απόπτωση (ΕΙΣΑΓΩΓΗ, κεφ. 4).

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι το σαλικυλικό νάτριο δρα σε ορισμένα ενζυμικά μονοπάτια. Ένα τέτοιο μονοπάτι, είναι και το μονοπάτι των MAPκινασών και ιδιαίτερα της p38, ERK 1/2 και JNK, που διαδραματίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων<sup>125-129</sup>. Επίσης αναφέρεται<sup>126-128,130</sup> ότι το σαλικυλικό νάτριο σε συγκέντρωση 20mM αναστέλλει την ERK 1/2 και επάγει το μονοπάτι της p38 κινάσης και της JNK σε κυτταρικό επίπεδο. Στη συνέχεια, θεωρήθηκε αναγκαίο να μελετηθεί η συμπεριφορά του σαλικυλικού νατρίου (NaSal) σε μικρότερη συγκέντρωση. Η συγκέντρωση των 5mM έχει αναφερθεί ότι επάγει το μονοπάτι των κινασών p38 και την JNK<sup>127-129</sup> (δηλαδή τα ίδια ένζυμα με τη συγκέντρωση 20mM) οριακά χωρίς να θεωρείται τοξική (6.5mM σαλικυλικού νατρίου είναι τοξικό στον ορό του αίματος<sup>131</sup>).



**Διάγραμμα 3.** Χωρογραφική απόδοση της επί τοις εκατό επιβίωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ) παρουσία 5 mM σαλικυλικού νατρίου.



Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων δίνονται στο Διάγραμμα 3, όπου φαίνεται ότι η επιβίωση των κυττάρων μελανώματος sbcl1 στις 24 h ανέρχεται σε 73,45% με  $p < 0,05$  (Πίνακας 17 B-D) και στις 48h είναι 62,39% με  $p < 0,001$  (Πίνακας 17 I-K) και στις 72 h 43,28% με  $p < 0,01$  (Πίνακας 17 P-R). Παρατηρείται επίσης, ότι το 5mM δεν επαναφέρει τα κύτταρα κοντά στον αρχικό αριθμό ( $t=0$ ). Η εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι είτε η συγκέντρωση των 20mM έχει τοξική δράση<sup>131</sup> είτε ότι οφείλεται και στην οριακή ή ελάχιστη ενεργοποίηση των παραπάνω ενζύμων.

**Πίνακας 17.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test των κυττάρων αναφοράς και των κυττάρων παρουσία σαλικυλικού νατρίου 5mM. Στις 24h (B-D), 48h (I-K) και 72h (P-R).

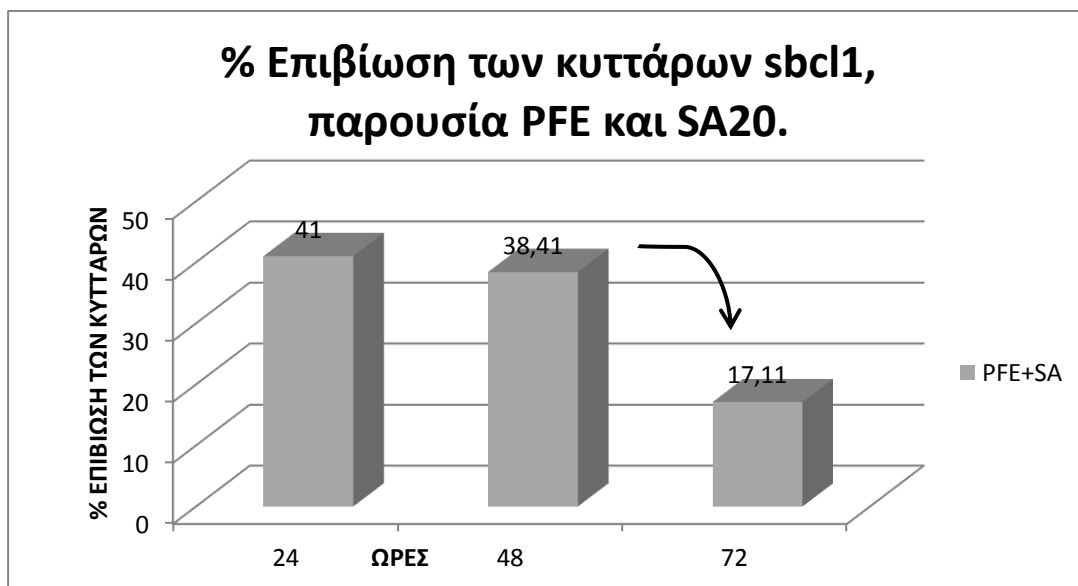
Paired t test B-D						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
B	6	0,9825	0,0547471	0,1341026	0,841768	1,123232
D	6	0,7216667	0,0285338	0,0698933	0,6483182	0,7950151
diff	6	0,2608333	0,0656757	0,1608719	0,0920086	0,429658
Mean (diff) = mean (B-D)				t= 3,9715		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Pr( T  >  t ) = 0,0106		
Paired t test I-K						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
I	6	1,585667	0,0477093	0,1168635	1,463026	1,708307
K	6	0,988	0,0403435	0,0988211	0,8842937	1,091706
diff	6	0,5976667	0,0773126	0,1893765	0,3989282	0,7964051
Mean (diff) = mean (I-K)				t= 7,7305		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Pr( T  >  t ) = 0,0006		
Paired t test P-R						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
P	6	2,274667	0,0173141	0,0424107	2,230159	2,319174
R	6	1,080333	0,0091821	0,0224915	1,05673	1,103937
diff	6	1,194333	0,0149324	0,0365769	1,155948	1,232718
Mean (diff) = mean (P-R)				t= 79,9825		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0		Pr( T  >  t ) = 0,0000		

### 12.3 Η επίδραση θεοφυλλίνης στα Sbc1

Η επιλογή της θεοφυλλίνης έγινε σαν συνέχεια της παλαιότερης εργασίας της ομάδας μας<sup>132</sup>, που έδειχνε ότι η ενεργοποίηση της p38 MAP κινάσης με 20mMσαλικυλικού οξέος αναστέλλεται με 1mMθεοφυλλίνης. Επειδή λοιπόν όπως αναφέραμε παραπάνω υπάρχει υποψία ότι το μονοπάτι των MAP κινασών είναι αυτό στο οποίο δρουν και οι πολυφαινόλες, μετρήσαμε και της δράση της θεοφυλλίνης στην αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και επαναλαμβάνουμε το πείραμα (πείραμα μέτρησης φωσφορυλιωμένης p38 MAP κινάσης) με σαλικυλικό νάτριο και όχι οξύ ώστε να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα.

**Πίνακας 18.** Ποσοστό επιβίωσης και αναστολής του ανάπτυξης στα sbcl1 κύτταρα μελανώματος υπό την επίδραση θεοφυλλίνης 1 mM.

% Επιβίωση/ Αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων sbcl1 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (κοντρόλ) παρουσία θεοφυλλίνης 1mM		
h	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
24	74,70 %	25,30%
48	109,3 %	0%
72	43,28 %	2,5%



**Διάγραμμα 4.** Χωρογραφική απόδοση της επί τοις εκατό επιβίωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ) παρουσία 1 mM θεοφυλλίνης

Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 4. Παρουσία θεοφυλλίνης, τα κύτταρα παρουσιάζουν επιβίωση στις 24h 74,70%  $p < 0,05$  ( Πίνακας 19 B-E), στις 48h παρατηρούμε μια αύξηση στην επιβίωση που ξεπερνά ακόμα και τα κύτταρα αναφοράς και φτάνει στο 109% (Πίνακας 19 I-L) και 97,5% (Πίνακας 19 P-S) στις 72h.

**Πίνακας. 19** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test των κυττάρων αναφοράς και των κυττάρων παρουσία θεοφυλλίνης 1mM. Στις 24h (B-E), 48h (I-L) και 72h (P-S).

Paired t test B-E						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
B	6	0,9825	0,0547471	0,1342026	0,841768	1,123232
E	6	0,734	0,0344229	0,0843184	0,6455132	0,8224868
diff	6	0,2485	0,0663615	0,1625518	0,0779123	0,4190877
Mean (diff) = mean (B-E)				t= 3,7446		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0134						
Paired t test I=L						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
I	6	1,585667	0,0477093	0,1168635	1,463026	1,708307
L	6	1,733667	0,0390014	0,095336	1,63341	1,833923
diff	6	-0,148	0,0710216	0,1739667	-	0,0345668
Mean (diff) = mean (I-L)				t= -2,0839		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0916						
Paired t test P-S						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
P	6	2,274667	0,0173141	0,0424107	2,230159	2,319174
S	6	2,217333	0,0293402	0,0718684	2,141912	2,292755
diff	6	0,0573333	0,0271976	0,0666203	-	0,1272471
Mean (diff) = mean (P-S)				t= 2,1080		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=5		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0888						

## 12.4 Σύγκριση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού ως προς τις υπόλοιπες ουσίες

Εδώ φαίνεται μία συγκριτική απόδοση της επί τοις εκατό αναστολής της ανάπτυξης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ), παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150 µg/ml, σαλικυλικού νατρίου 20 mM και 5 mM και θεοφυλλίνης 1 mM



**Διάγραμμα 5.** Συγκριτική χωρογραφική απόδοση της επί τοις εκατό αναστολής των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ), παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150 µg/ml (μαύρο μοτίβο), σαλικυλικού νατρίου 20 mM (ανοιχτό γκρι) και 5 mM (γκρι) και θεοφυλλίνης 1 mM (ριγέ).

Από το Διάγραμμα 5, παρατηρούμε ότι το σαλικυλικό νάτριο 20mM και το πολυφαινολικό εκχύλισμα του ροδιού σε συγκέντρωση 150 µg/mL προκαλούν τη μεγαλύτερη αναστολή. Σε συνέχεια του παραπάνω συμπεράσματος καταλήγουμε στο πιο δυνατό συμπέρασμα αυτής της εργασίας, το οποίο είναι ότι 20mM σαλικυλικού οξέος, που είναι τοξικό σύμφωνα με την εργασία του Betsy Frantz και συν. 1995<sup>131</sup>, και το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού,

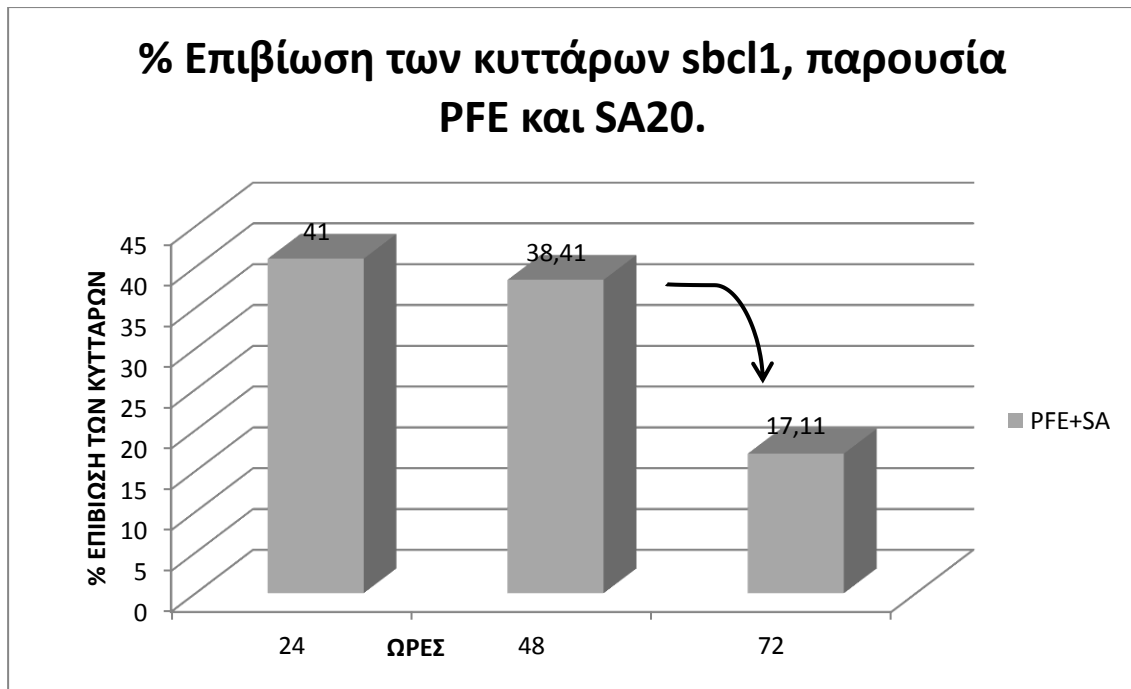
προκαλούν το ίδιο ποσοστό αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (περίπου 80 %) στα κύτταρα μελανώματος *sbcl1*

### 12.5 Συγχορήγηση 20mM σαλικυλικού νατρίου με πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού και με θεοφυλλίνη

Προκειμένου να φανεί αν υπάρχει συνέργια μεταξύ σαλικυλικού νατρίου και πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού προβήκαμε στο συγκεκριμένο πείραμα. Εισάγαμε στα κύτταρα το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού σε τελική συγκέντρωση 150mg/ml, ή της θεοφυλλίνης 1mM αντίστοιχα, 30 λεπτά μετά την επίδραση 20mM σαλικυλικού νατρίου. Στον Πίνακα 20 δίνεται ο αριθμός επιβίωσης των *sbcl1* κυττάρων μετά τη συγχορήγηση σαλικυλικού νατρίου 20mM / πολυφαινολικού εκχυλίσματος 150mg/mL και σαλικυλικού νατρίου 20mM/ θεοφυλλίνης 1mM

**Πίνακας 20.** Αποτελέσματα επιβίωσης των *sbcl1* υπό την επίδραση συγχορήγησης σαλικυλικού νατρίου 20mM / πολυφαινολικού εκχυλίσματος 150mg/mL και σαλικυλικού νατρίου 20mM/ θεοφυλλίνης 1mM.

% Αναστολή Ανάπτυξης/ Επιβίωσης των κυττάρων παρουσία δύο πειραματικών ουσιών			
h	Ουσία	PFE	θεοφυλλίνη
24	SA 20mM	41% επιβίωση	36,5 % επιβίωση
		59,0% αναστολή	63,5% αναστολή
48	SA 20mM	38,4% επιβίωση	23,3 % επιβίωση
		61,3% αναστολή	76,7% αναστολή
72	SA 20mM	17,1% επιβίωση	13,3 % επιβίωση
		82,9% αναστολή	86,7% αναστολή



**Διάγραμμα 6** . Χωρογραφική απόδοση επί τοις εκατό επιβίωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος σε σχέση με το ποσοστό των κυττάρων αναφοράς (κοντρόλ), παρουσία συγχορήγησης 20 mM σαλικυλικού νατρίου και PFE 150μg/ml.

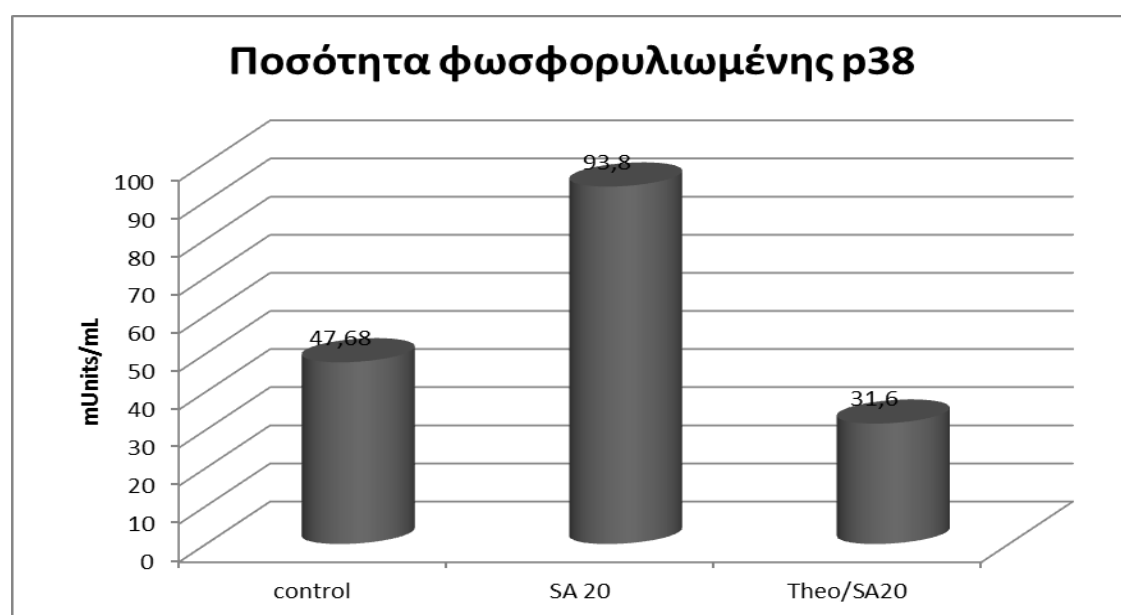
Από το Διάγραμμα 6 φαίνεται ότι η κυτταρική επιβίωση είναι 68,46% στις 24 h, 74,78% στις 48 h και 18,56% στις 72 h και τα τρία με  $p < 0,001$  ( Πίνακας 21, B-G, I-N, P-Υαντίστοιχα).

Αν τα αποτελέσματα τα συγκρίνουμε με αυτά του διαγράμματος 1 που αφορά την κυτταρική επιβίωση κατά την χρησιμοποίησή μόνο του πολυφαινολικού εκχυλίσματος του ροδιού, βλέπουμε μία σημαντική διαφορά μεταξύ 24 (Πίνακας 22 F-G) και 48 h (Πίνακας 22 M-N), αλλά όχι στις 72 h (Πίνακας 22 T-U), πράγμα που σημαίνει ότι τα 20mM σαλικυλικού νατρίου επιτάχυναν την απόπτωση των sbcl1 στις συγκεκριμένες h, ενώ είχαν το ίδιο αποτέλεσμα στις 72 h.

Αν συγκρίνουμε το Διάγραμμα 5 με το Διάγραμμα 2 παρατηρούμε ότι η κυτταρική επιβίωση στην περίπτωση της συγχορήγησης των δύο ουσιών (20mm σαλικυλικού νατρίου και πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού) και 20mm σαλικυλικού νατρίου, βλέπουμε ότι ο ρυθμός αναστολής της ανάπτυξης που προκαλείται είναι ανάλογος και στα δύο διαγράμματα.

## 12.6 Αποτελέσματα έκλυσης της φωσφορυλιωμένης p38 MAP κινάσης στα κύτταρα sbcl1

Επειδή, όπως προαναφέρθηκε το σαλικυλικό νάτριο και η θεοφυλλίνη φαίνεται από βιβλιογραφικές αναφορές<sup>125-129,132</sup> ότι προκαλούν απόπτωση μέσω του μονοπατιού της p38 MAPκινάσης, μετρήσαμε το ποσοστό της φωσφορυλιωμένης μορφής στα sbcl1, ώστε να δούμε αν και στο μελάνωμα προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού μέσω αυτής της οδού. Προς τον σκοπό αυτό μεσολάβησε λύση των κυττάρων



**Διάγραμμα 8.** Ποσότητα φωσφορυλιωμένης p38 MAP κινάσης, μέσα στα κύτταρα sbcl1 σαλικυλικού νατρίου 20mM και παρουσία θεοφυλλίνης 1mM/σαλικυλικού νατρίου 20mM

Στο Διάγραμμα 8 φαίνονται τρεις βασικές πληροφορίες, πρώτον ότι η κυτταρική μας σειρά sbcl1 έχει εξ' αρχής ικανή ποσότητα p38 MAPκινάσης φωσφορυλιωμένη. Αυτό είναι ένα λογικό συμπέρασμα εφόσον πρόκειται για καρκινικά κύτταρα μελανώματος και το ένζυμο αυτό προκαλεί κυτταροπροστασία και τις περισσότερες φορές προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Δεύτερον, παρουσία σαλικυλικού νατρίου έχουμε αύξηση σχεδόν στο διπλάσιο ποσοστό ενώ μαζί με τη θεοφυλλίνη μείωση σε σχέση με το κοντρολ (από λύση κυττάρων αναφοράς).

Τρίτον, αν το συνδυάσουμε με το διάγραμμα 2, θα λέγαμε ότι η αύξησή της φωσφορυλιωμένης μορφής του ενζύμου συνηγορεί με την απόπτωση, όταν όμως συνδυάσουμε και το διάγραμμα 7, καταρρίπτουμε το προηγούμενο συμπέρασμα γιατί εδώ φαίνεται ξεκάθαρα ότι το ένζυμο που μετρήσαμε δεν έχει καμία σχέση με την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Αυτό συμβαίνει γιατί στο παραπάνω πείραμα μετρήσαμε την p38 MAPκινάση, χωρίς να προσδιορίσουμε την ισομορφή της, όμως οι τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) ,πιθανόν, εμφανίζονται διαφορετικές χρονικές στιγμές και ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο με διαφορετικό τρόπο. Βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη χρονική έκφραση της p38 MAP κινάσης σε κύτταρα μελανώματος δεν υπάρχουν.

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι το σαλικυλικό άλας<sup>133</sup> στα κύτταρα Colo853 προκαλεί μετά από 24 h την εμφάνιση μίας ισομορφής της p38 MAPκινάσης. Στην ίδια εργασία παρουσία του εκλεκτικού αναστολέα SB203580 της p38 μαζί το σαλικυλικό άλας αυξάνει το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στις 24, 48 και 72 h, όπως ακριβώς και στα κύτταρα B16 μελανώματος ποντικού<sup>133</sup>. Επιπρόσθετα, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ενεργοποιεί μία ισομορφή της p38 MAP κινάσης με μέγιστη φωσφορυλίωση στα 20 min, η οποία δεν αναστέλλεται από τα 10mM SB203580 εκλεκτικού αναστολέα και στα ίδια κύτταρα μελανώματος ποντικού<sup>133</sup>. Επιπρόσθετα, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ενεργοποιεί ισομορφή της p38 MAP κινάσης με μέγιστη φωσφορυλίωση στα 20 min, η οποία δεν αναστέλλεται από τα 10mM SB203580 εκλεκτικού αναστολέα και στα ίδια κύτταρα μελανώματος B16 η p38 έχει τη μεγαλύτερη φωσφορυλίωση 1 h μετά την επίδραση της μελανοτρόπου ορμόνης MSH. Η δράση της αναστέλλεται από τον αναστολέα SB203580 10mM στο πέρας των 72h<sup>134</sup>.

Σε κυτταρικές σειρές H-157 διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας SB202190 της p38 MAP κινάσης αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του ενζύμου που προκαλείται από τα ανάλογα λιπιδό-φωσφατυδιλινοσιπολικού αιθέρα στα 20-30 min. Στην ίδια κυτταρική σειρά H-157 αν ο αναστολέας SB προστεθεί μετά από 2 h δεν μπορεί να αναστείλει τη φωσφορυλίωση του ενζύμου που επάγεται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είτε στα 15 min είτε στις 2h<sup>135</sup>.



Από τα ανωτέρω, γίνεται εμφανές ότι η ενεργοποίηση των p38 κινασών, εξαρτάται από το είδος του παράγοντα ενεργοποίησης και πιθανόν και από το είδος του κυττάρου.

Για να δοθεί σαφέστερη απάντηση για τα μεταγωγικά μονοπάτια που μεσολαβούν στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων, σχεδιάστηκαν πειράματα που στοχεύουν στη συγκεκριμένη ισομορφή του ενζύμου, την p38α MAP κινάση.

### **13. ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ M5 ΚΑΙ A375.**

Στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού (PFE) για τη μελέτη της συμπεριφοράς του έναντι της ικανότητας ανάπτυξης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος. Από τη σειρά των πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι το (PFE) αναστέλλει αυτή την ικανότητα των sbcl1 κυττάρων μελανώματος. Ιδιαίτερα, διαπιστώθηκε ότι η απόδοση ανταγωνίζεται εκείνη του σαλικυλικού νατρίου με συγκέντρωση 20mM.

Όπως προαναφέρθηκε (σελ.56) τα sbcl1 κύτταρα μελανώματος χαρακτηρίζονται από μακριά τελομερή<sup>123</sup>. Τα τελομερή είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες των χρωμοσωμάτων<sup>136</sup>, δηλαδή λειτουργούν κυτταροπροστατευτικά. Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι τα μακριά τελομερή προκαλούν προστασία σε καταστάσεις στρες<sup>137</sup>.

Μετά από αυτές τις παρατηρήσεις η έρευνα επεκτάθηκε στη μελέτη των πιο κλασσικών σειρών μελανώματος, όπως είναι τα κύτταρα A375 και τα M5, χρησιμοποιώντας για τη μελέτη μόνο το πολυφαινολικό εκχύλισμα. Για μέτρο σύγκρισης της απόδοσης λήφθηκε ένα εμπορικό ολικό εκχύλισμα ροδιού (για λόγους δεοντολογίας δεν μπορεί να δοθεί το όνομα). Η επιλογή του εμπορικού (ολικού) εκχυλίσματος ροδιού επιβλήθηκε ως μέτρο σύγκρισης, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα<sup>138-141</sup> για την αναστολή της ανάπτυξης κυττάρων προσάτη και πνεύμονα αλλά και άλλων κυτταρικών σειρών. Η διαφοροποίηση ως προς τις πολυφαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι ότι το εμπορικό εκχύλισμα περιέχει το σύνολο του εκχυλίσματος του ροδιού και όχι μόνο τις πολυφαινόλες. Παρόλο, που οι παραπάνω έρευνες αναφέρουν πιθανότητα ότι η θετική απόκριση του PFE στον

καρκίνο αποδίδεται στις πολυφαινόλες δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να αποδεικνύει την υπόθεση αυτή. Επομένως, το πείραμα αυτό θεωρήθηκε αναγκαίο να γίνει για δύο λόγους. Πρώτον για να διακρίνουμε τον πραγματικό ρόλο των πολυφαινολών σε σύγκριση πάντα με το ολικό εκχύλισμα και δεύτερον να δούμε τη δράση τους σε νέες κυτταρικές σειρές όπως αυτές του μελανώματος M5 και A375. Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και τα προς μελέτη δείγματα κυττάρων λήφθηκαν στις 48 h και 72 h. Οι χρόνοι αυτοί επιλέχθηκαν επειδή φάνηκε, και στα προηγούμενα πειράματά μας, ότι στα χρονικά αυτά διαστήματα ισχυροποιείται η δράση των πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού, αλλά και για να είμαστε σύμφωνοι με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Στον Πίνακα 23 δίνονται τα στατιστικά δεδομένα του πειράματος. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Stata/SE 12.0 με στάθμη εμπιστοσύνης 99% και 95%. Με κωδικό A αναφέρεται το i πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού ενώ με κωδικό B το ολικό εκχύλισμα. Επίσης, με κωδικό C ονομάζεται το δείγμα αναφοράς (κοντρόλ), όπου σαν δείγμα αναφοράς ορίζεται ο αριθμός των κυττάρων που χωρίς την προσθήκη καμμιάς από τις ουσίες για χρόνους 48 h και 72 h.

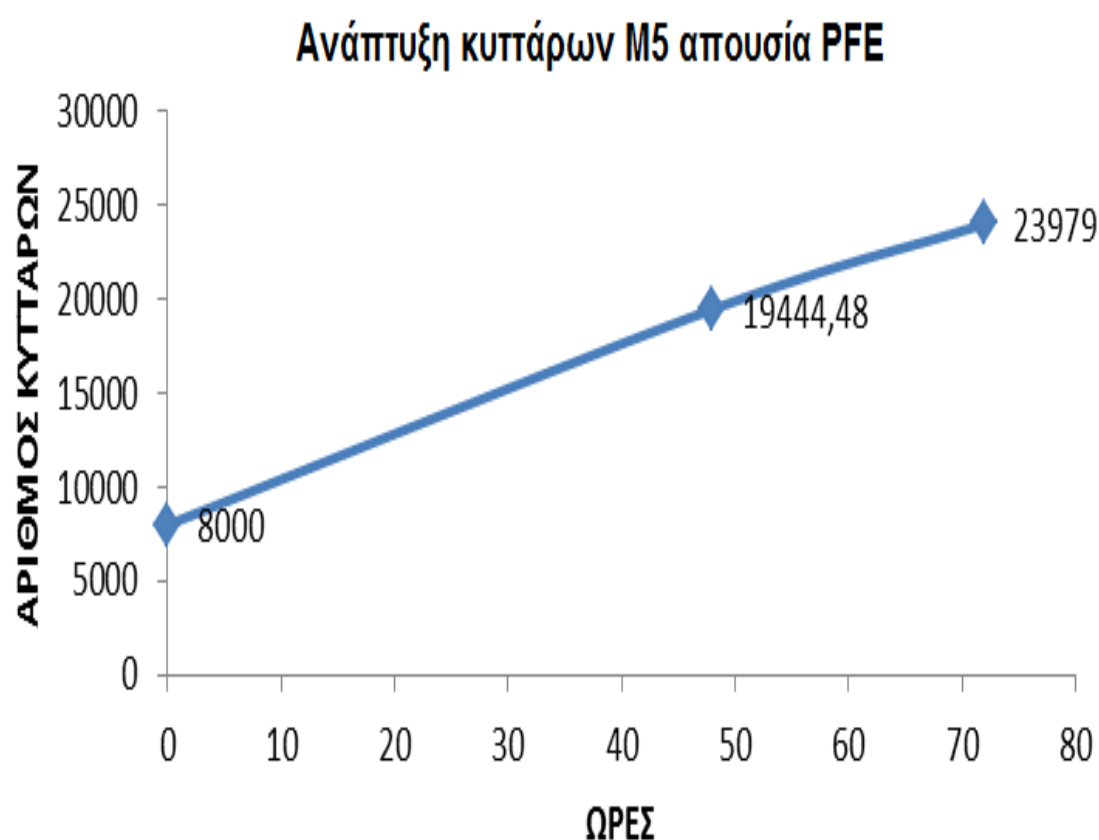
**Πίνακας 23** Στατιστικά δεδομένα του πειράματος. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STATA με Paired t Test σε στάθμη εμπιστοσύνης 99%. A πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού, B ολικό εκχύλισμα και C δείγμα αναφοράς

Variable	Obs	Mean	Std Dev	Min	Max
M5C4B	3	1944.48	3407.415	16665.94	23246.27
M5CA4B	3	<b><u>3455.003</u></b>	628.6084	2958.25	4161.72
M5B4B	3	14396.34	1311.855	13280.17	15841.14
M5C72	3	23978.34	2256.805	21895.68	26376.16
M5A72	3	2646.847	192.0237	2434.58	2808.48
M5B72	3	12770.32	1243.379	11957.2	14201.63
A375C4B	3	17928.21	384.13	17567.81	18332.33
A375A4B	3	<b><u>7550.35</u></b>	1578.157	6463.07	9360.46
A375B4B	3	15862.99	432.7366	15539.86	16354.63
A375C72	3	19614	720.1548	19171.4	20445.05
A375A72	3	<b><u>5067.843</u></b>	648.304	4692.99	5816.44
A375B72	3	15191.51	231.5393	14980.76	15439.36

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 23, η υπεροχή του πολυφαινολικού εκχυλίσματος διατηρείται ως προς τις μέσες τιμές του αριθμού των κυττάρων καθώς και στις τυπικές αποκλίσεις των τιμών.

### 13.1 Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς M5, παρουσία πολυφαινολών.

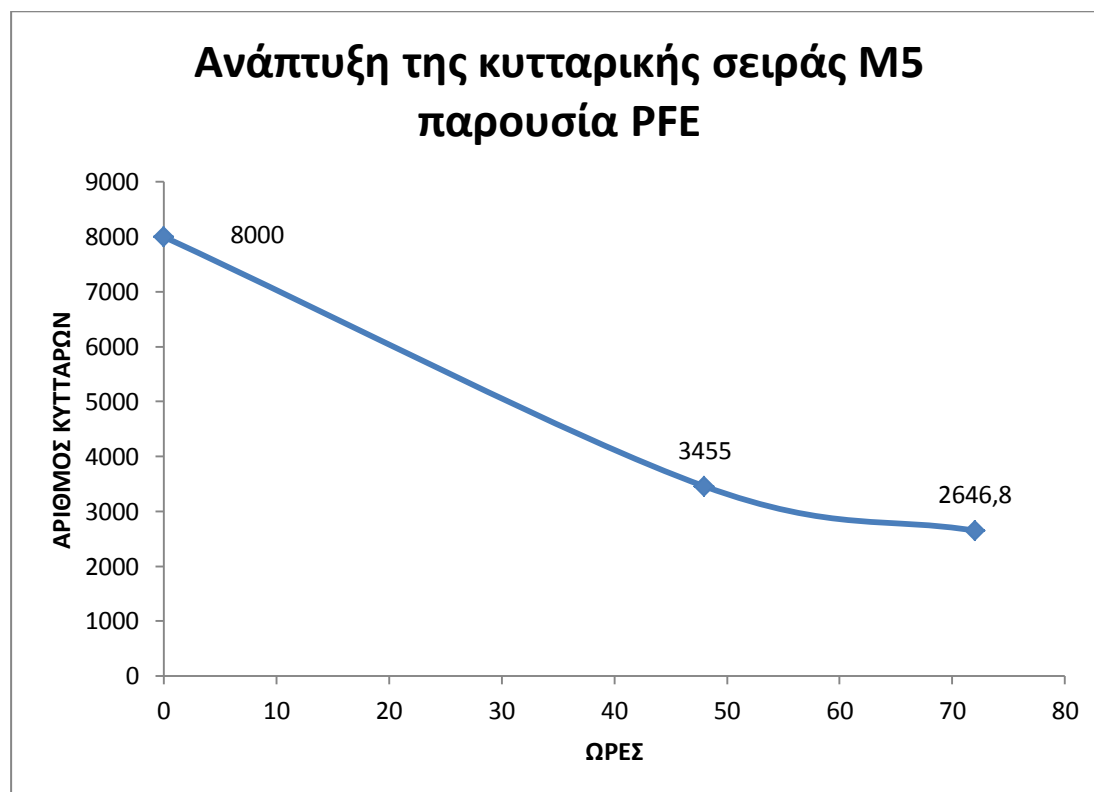
Στο Διάγραμμα 9 φαίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του αριθμού των κυττάρων του δείγματος αναφοράς που λήφθηκαν σε 0, 48 και 72 h για M5 κύτταρα μελανώματος. Ως τελικός αριθμός λαμβάνεται η μέση τιμή.



**Διάγραμμα 9.** Ρυθμός ανάπτυξης του αριθμού των κυττάρων του δείγματος αναφοράς (κοντρόλ) στις 0, 48 και 72 h στα M5 κύτταρα μελανώματος. Αναφέρονται οι μέσες τιμές

Παρατηρούμε ότι, χωρίς την παρουσία οποιουδήποτε αναστολέα τα κύτταρα M5 σε 72 h έχουν τριπλάσιο αριθμό κυττάρων σε σχέση με την αρχική τιμή. Στο Διάγραμμα 10 φαίνεται η καμπύλη μεταβολής της απόλυτης τιμής των

M5 κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού. Διαπιστώνεται ότι ο αριθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων της σειράς M5 μειώνεται σημαντικά.



**Διάγραμμα 10.** Πτωτική απόλυτη τιμή του αριθμού των κυττάρων M5 παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού σε 0, 48 και 72 h.

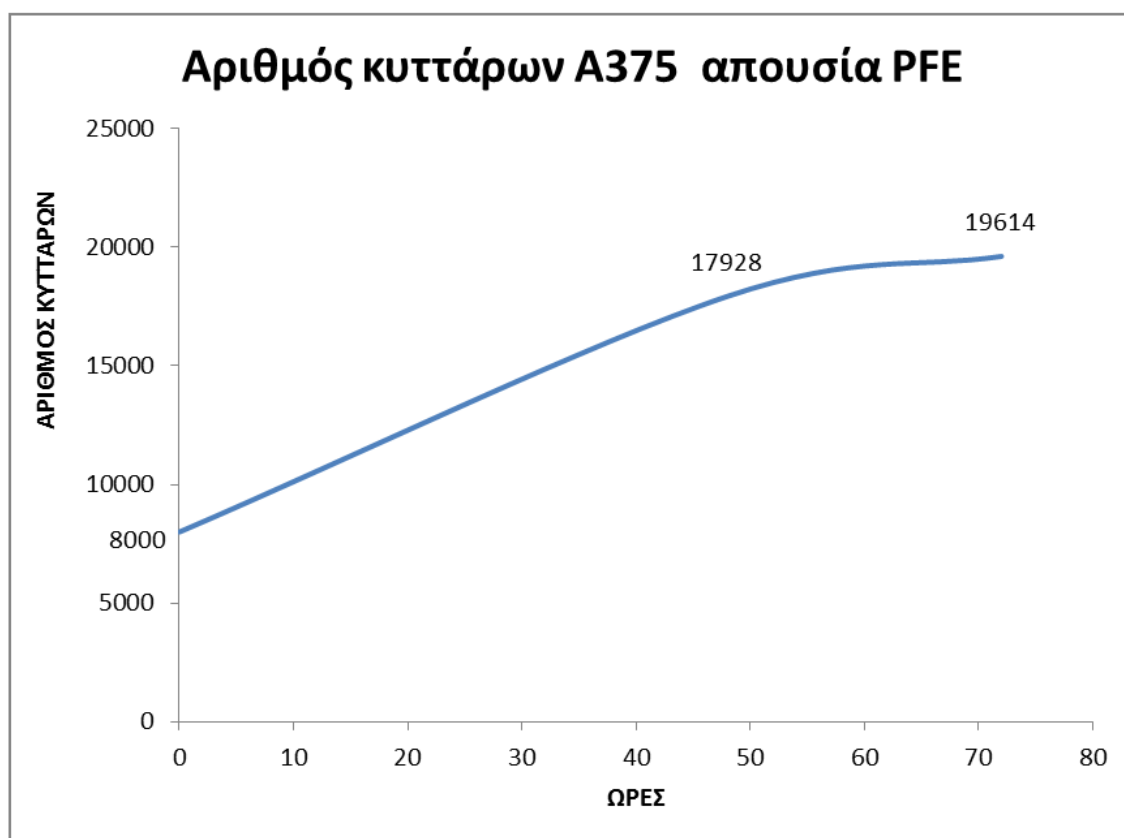
Λαμβάνοντας σε χρόνο  $t=0$  τον συνολικό αριθμό των αρχικών κυττάρων 8000 παρατηρείται μια πτωτική τάση στην ανάπτυξη των κυττάρων η οποία συνεχίζει μέχρι τις 72 h. Αυτή η πτωτική τιμή επιβίωσης των κυττάρων προκαλείται από τις πολυφαινόλες του ροδιού καθώς στο Διάγραμμα 9 τα κύτταρα στα οποία δεν εισήχθη πολυφαινολικό διάλυμα είχαν ανοδική πορεία επιβίωσης.

Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι πολυφαινόλες του ροδιού όχι μόνο παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων M5, αλλά και δρουν και κυτταροτοξικά καθώς ο αριθμός των κυττάρων δεν αυξάνεται σε κανένα στάδιο αλλά μειώνεται σε όλες τις φάσεις του πειράματος (70% μείωση στις 72 h). Αυτό

δείχνει πως το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού για τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος οδήγησε ένα μέρος των αρχικών κυττάρων σε θάνατο.

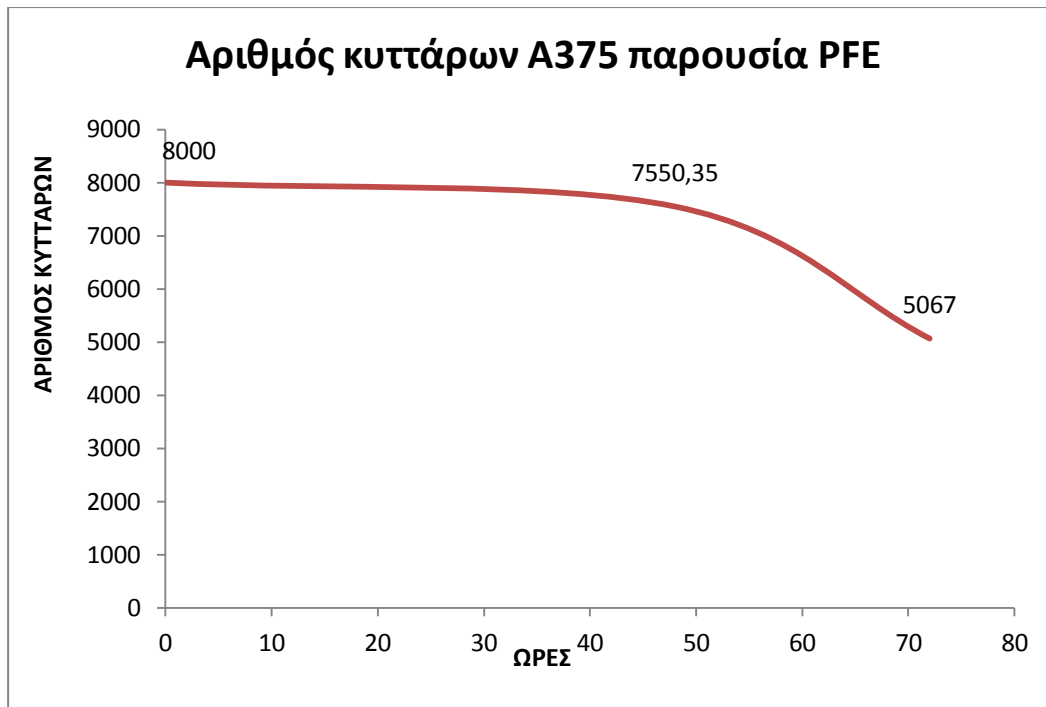
### 13.2 Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς A375, παρουσία πολυφαινολών.

Στα Διαγράμματα 11 και 12 δίνονται σε αντιστοιχία οι καμπύλες ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών A375 απουσία και παρουσία PFE ροδιού.



**Διάγραμμα 11.** Αυξητικός ρυθμός αύξησης του δείγματος αναφοράς (κοντρόλ) με μέσες τιμές στις 0, 48 και 72 h στα M5 κύτταρα μελανώματος.

Στο Διάγραμμα 11 φαίνεται η καμπύλη του αυξητικού ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων A375 απουσία πολυφαινολών PFE, ώστε να ληφθεί ως καμπύλη αναφοράς (ανάπτυξη κοντρόλ) σε 0 h, 48h και 72 h. Παρατηρείται ότι, χωρίς την παρουσία αναστολέα τα κύτταρα A375 σε χρόνο 72 h έχουν σχεδόν το διπλάσιο αριθμό κυττάρων, σε σχέση με τον αρχικό αριθμό των 8000 κυττάρων. Επομένως, σε σύγκριση με τα κύτταρα M5 έχουν μικρότερη πολλαπλασιαστική ικανότητα.



**Διάγραμμα 12.** Πτωτική απόλυτη τιμή του αριθμού των κυττάρων A375 παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού σε 0, 48 και 72 h.

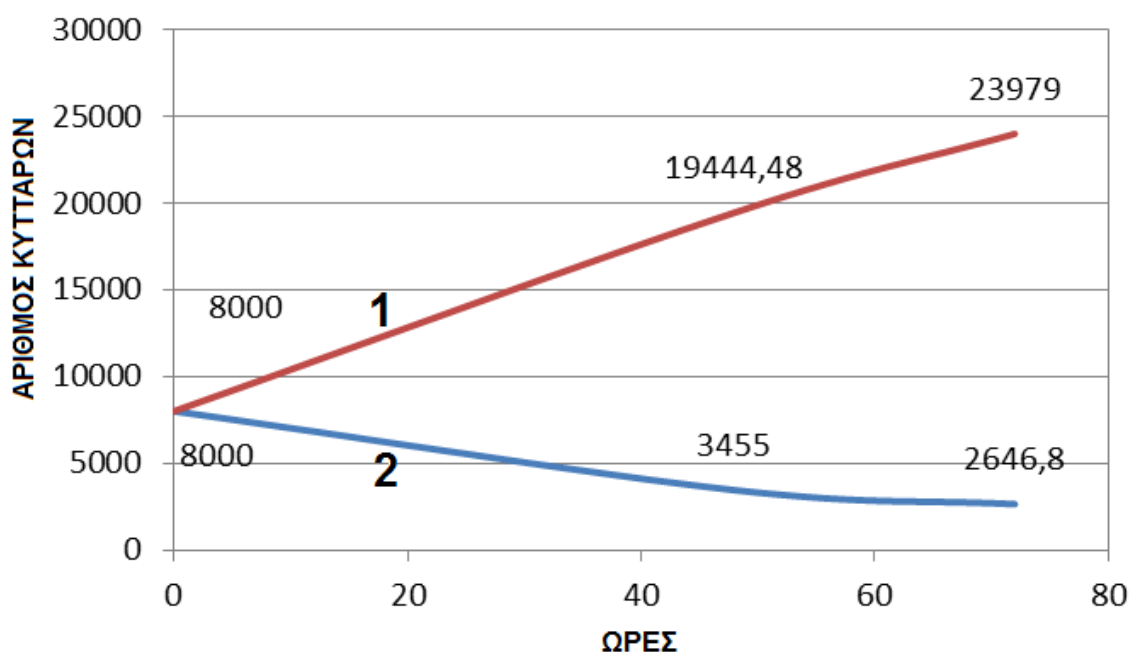
Στο Διάγραμμα 12 φαίνεται η καμπύλη μεταβολής της απόλυτης τιμής των κυττάρων A375 παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού. Διαπιστώνεται ότι ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων της σειράς A375 μειώνεται σημαντικά στις 48 h, ενώ η μείωση συνεχίζεται μέχρι τις 72 h ως προς τον αρχικό αριθμό κυττάρων σε χρόνο  $t=0$  που είναι 8000. Η πτωτική αυτή τάση που προκαλείται ως προς τον αρχικό αριθμό κυττάρων σε χρόνο μηδέν, δείχνει ότι οι πολυφαινόλες του ροδιού επιδρούν ανασταλτικά στη σειρά των κυττάρων A375. Όπως παρατηρήθηκε για τα κύτταρα M5, οι πολυφαινόλες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων μελανώματος A375, αλλά δρουν και κυτταροτοξικά. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός ότι δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων, ενώ η κυτταροτοξική επειδή ο αριθμός των κυττάρων μειώνεται σημαντικά σε ποσοστό περίπου 40% μείωση στις 72 h σε σχέση με τα κύτταρα στο χρόνο  $t=0$ .

### 13.3 Ανάπτυξη κυττάρων A375 και M5, παρουσία πολυφαινολών (σύγκριση με τα δείγματα αναφοράς).

Στα Διαγράμματα 13 και 14 δίνονται για σύγκριση οι καμπύλες διαγράμματα μεταβολής των κυττάρων των καρκινικών σειρών M5 και A375 χωρίς τη χορήγηση πολυφαινολών (καμπύλες αναφοράς) και με χορήγηση πολυφαινολών από εκχύλισμα ροδιού (PFE).

Στο Διάγραμμα 13, φαίνεται η σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων M5 απουσία και παρουσία πολυφαινολών PFE. Η γραμμή 1 αντικατοπτρίζει τον αριθμό κυττάρων του κοντρόλ και η γραμμή 2 των αριθμό των κυττάρων υπό την επίδραση των πολυφαινολών.

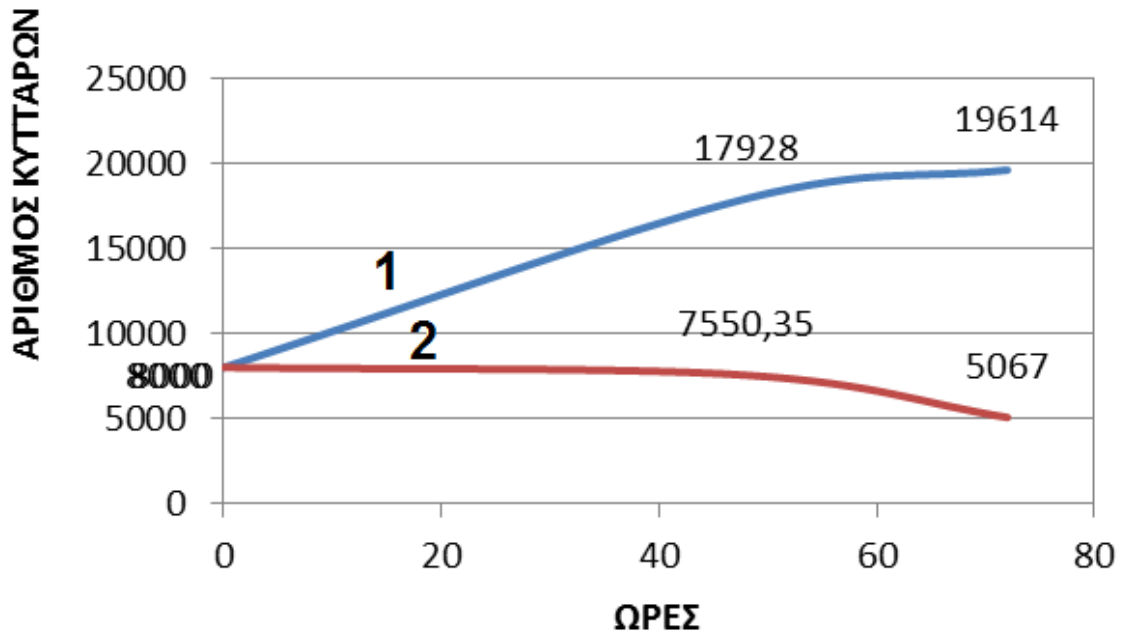
**Συγκριτικό γράφημα επιβίωσης των κυττάρων M5 απουσία/παρουσία PFE**



**Διάγραμμα 13.** Αριθμός κυττάρων ανάπτυξης M5 κυττάρων. (1) απουσία και (2) παρουσία πολυφαινολών από εκχύλισμα ροδιού (PFE).

Από την απόκλιση των δύο καμπυλών δείχνει τη μεγάλη επίδραση στην αναστολή ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων που προκαλούν οι πολυφαινόλες από εκχύλισμα ροδιού στα καρκινικά κύτταρα M5. .

### Σύγκριση αριθμού κυττάρων A375 απουσία και παρουσία PFE



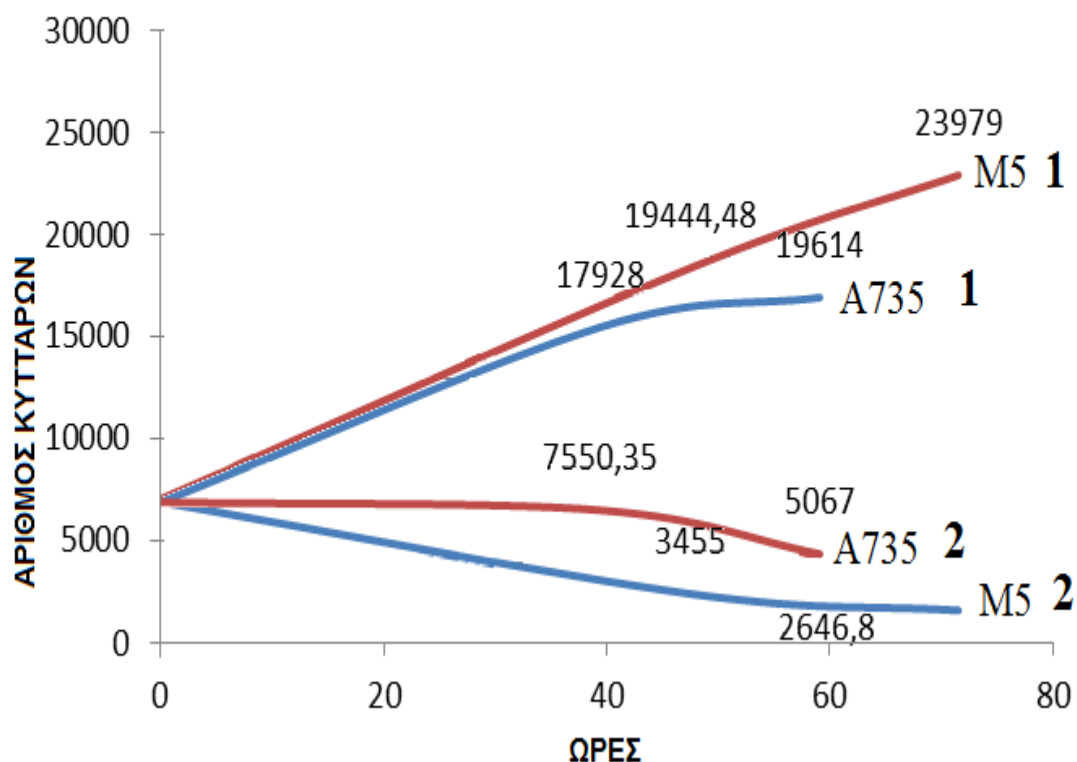
**Διάγραμμα 14.** Σύγκριση αριθμού κυττάρων A375: (1) απουσία και (2) παρουσία PFE

Σε αντιστοιχία στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων A375, απουσία και παρουσία εκχυλίσματος πολυφαινολών. Η απόκλιση των δύο καμπυλών δείχνει και στην περίπτωση αυτή τη σημαντική μείωση που προκάλεσε το πολυφαινολικό διάλυμα στα παραπάνω κύτταρα.

Προκειμένου να δοθεί μία καλύτερη απεικόνιση της επίδρασης των πολυφαινολών επί των δύο κυτταρικών καρκινικών σειρών M5 και A375 συγκεντρώσαμε τις καμπύλες μεταβολής στο ίδιο διάγραμμα. Το Διάγραμμα 15 δείχνει τις καμπύλες μεταβολής του αριθμού των καρκινικών κυττάρων A375 και M5 παρουσία και απουσία πολυφαινολών.



### Σύγκριση αποτελεσμάτων των M5 και A375

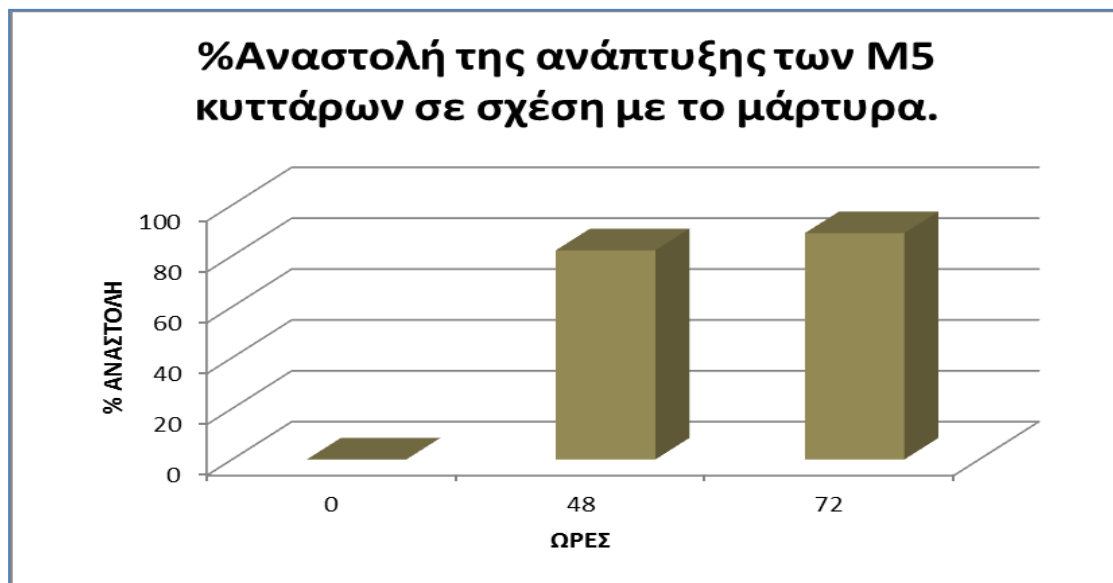


**Διάγραμμα 15.** Σύγκριση αριθμού κυττάρων A375 και M5: (1) απουσία και (2) παρουσία PFE

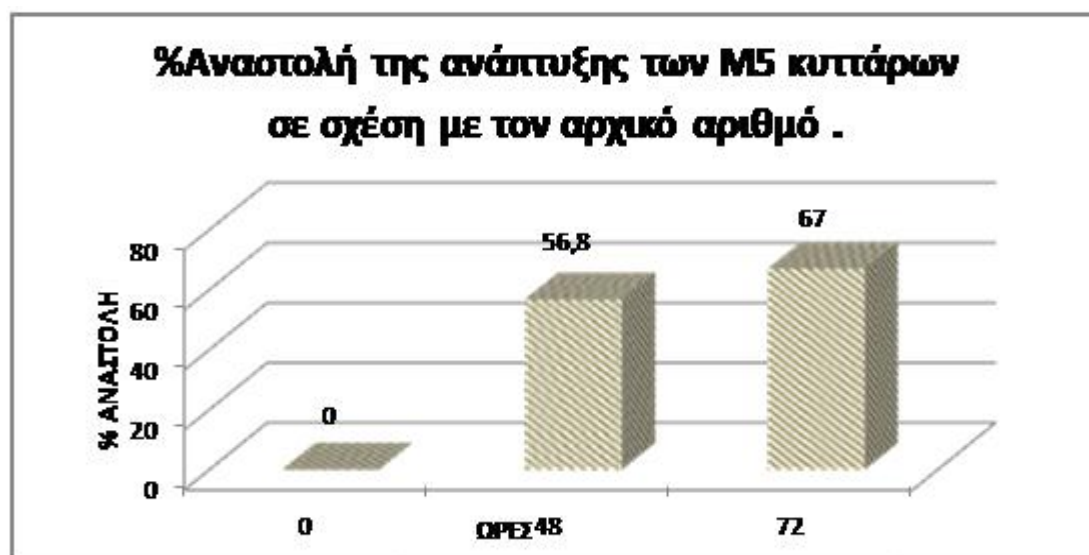
Όπως φαίνεται από τις καμπύλες 2 (Διάγραμμα 15) που αντιστοιχούν στη μεταβολή ανάπτυξης των κυττάρων παρουσία πολυφαινολών. Η σύγκριση των τελικών αριθμών καρκινικών των κυττάρων δεν μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι PFE προκαλούν μεγαλύτερη απόδοση στα κύτταρα M5 από τα κύτταρα A375. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενο, επειδή οι κυτταρικές σειρές μελανώματος A375 και M5 διαφέρουν μεταξύ τους. Αν όμως χρησιμοποιηθεί το στατιστικό υπολογιστικό πρόγραμμα STATA προκύπτει ότι στα A375 κύτταρα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, υπάρχει μεγαλύτερη στατιστική διαφορά, ως προς τη μείωση του αριθμού των κυττάρων.

### 13.4 Αναστολή % της ανάπτυξης των κυττάρων M5 και A375 παρουσία πολυφαινολών.

Στα Διαγράμματα 16-18 δίνονται τροποποιημένες οι τιμές του ρυθμού μεταβολής των κυττάρων, είτε σε ανάπτυξη είτε σε μείωση, σε επί τοις εκατό (%) αναστολή. Η επιλογή αυτή έγινε για να φανεί και να σχολιασθεί η αποδοτικότητα του εκχυλίσματος σε σχέση με τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.



**Διάγραμμα 16.** Χωρογραφική απόδοση της % αναστολής των M5 κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα.



**Διάγραμμα 17.** Χωρογραφική απόδοση της % αναστολής των M5 κυττάρων σε σχέση με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων.

Στο Διάγραμμα 16 το PFE από τις πρώτες 48 h έχει αναστείλει την ανάπτυξη των M5 κατά 70% περίπου προβάλλοντας στατιστική σημαντικότητα (Πίνακας 24). Στις 72 h φτάνει το 80% της αναστολής σε σχέση με τον κοντρολ, επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά  $p < 0,01$  (Πίνακας 24). Όμως, μεταξύ των 48 και 72 h δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 25). Αυτό σημαίνει πως η δράση των πολυφαινολών μειώθηκε μετά το πέρας των 48 ωρών.

**Πίνακας 24.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα M5 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ των κυττάρων αναφοράς(C) και των κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150 $\mu$ g/mL(A). Στις 48h (M5C48-M5A48) και 72h (M5C72-M5A72).

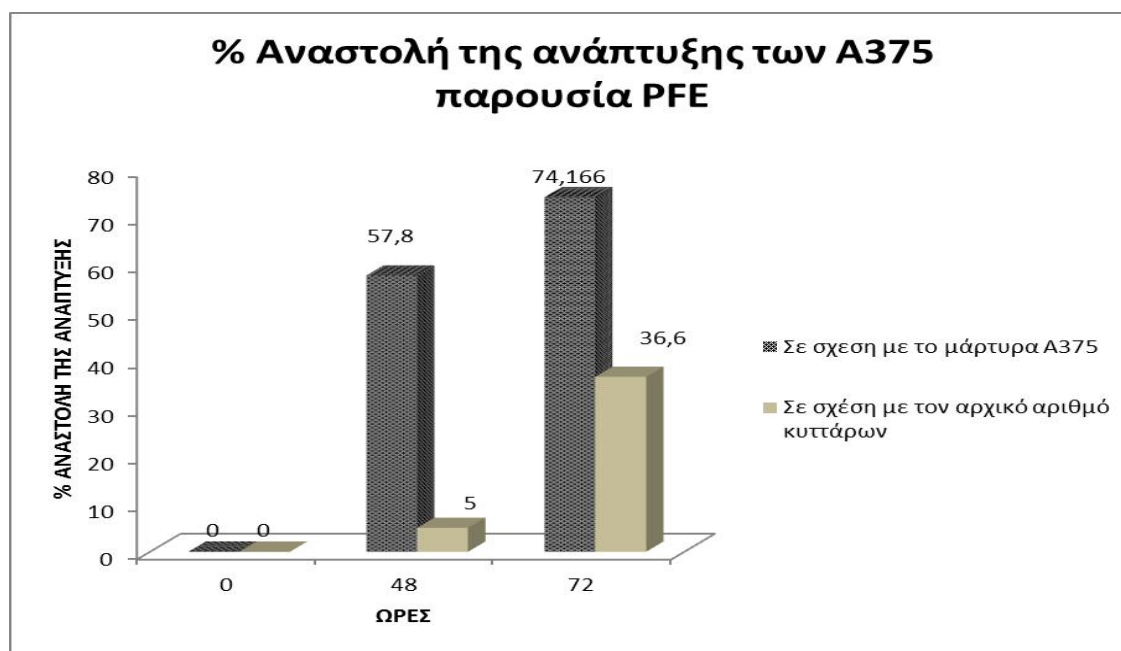
Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
M5C48	3	19444,48	1967,272	3407,425	10979,99	27908,96
M5A48	3	3455,003	362,9272	628,6084	1893,454	5016,553
diff	3	15989,47	1656,013	2868,299	8864,224	23114,72
Mean (diff) = mean (M5C48-M5A48)				t= 9,6554		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,010						
Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
M5C72	3	23978,34	1302,967	2256,805	18372,13	29584,55
M5A72	3	2646,847	110,8649	192,0237	2169,833	3123,86
diff	3	21331,49	1262,409	2186,556	15899,79	26763,2
Mean (diff) = mean (M5C72-M5A72)				t=16,8975		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0035						

**Πίνακας 25.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα M5 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ των κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150 $\mu$ g/mL(A) στις 48h και 72h (M5A48-M5A72).

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
M5C48	3	19444,48	1967,272	3407,425	10979,99	27908,96
M5A72	3	2646,847	110,8649	192,0237	2169,833	3123,86
diff	3	808,1567	272,6289	472,2071	-364,8708	1981,184
Mean (diff) = mean (M5C48-M5A72)				t= 2,9643		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0975						

Αυτό συμβαίνει επειδή, όπως προαναφέρθηκε, οι πολυφαινόλες έχουν τη δυνατότητα να είτε να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, είτε και επιδιορθώνουν τυχόν λάθη στο DNA, λόγω της χημικής τους δομής, όμως τα μεταβολικά τους προϊόντα μπορεί να ανταγωνίζονται τα καρκινικά κύτταρα. Μία δεύτερη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι το ενζυμικό σύστημα που μεσολαβεί στην απόπτωση, διεγείρεται περισσότερο κατά το πρώτο χρονικό διάστημα εισαγωγής της ουσίας.

Η αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων επιτεύχθηκε, αλλά στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρούμε περαιτέρω ότι δεν έχουμε μόνο μείωση του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και σε σχέση με τον αρχικό αριθμό κυττάρων στο  $t=0$  (Διαγράμματα 10 και 17). Επομένως, στα πειράματά μας παρατηρούμε ότι ένα μέρος των αρχικών κυττάρων οδηγήθηκε σε απόπτωση ή κυτταρικό θάνατο. Αυτό ισχύει και για τις δύο κυτταρικές σειρές με αυτή των M5 να φτάνει στο 70% στις 72 h (Διάγραμμα 17), ενώ στα A375 στο 35% στις 72 h (Διάγραμμα 18).



**Διάγραμμα 18.** Χωρογραφική απόδοση της % αναστολής των A375 κυττάρων παρουσία PFE. Μαύρο μοτίβο σε σχέση με τον μάρτυρα και γκρι με τον αριθμό των κυττάρων.

Ακόμα πιο σημαντικό θεωρείται το γεγονός πως εξαρχής και καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και στα δύο συστήματα δεν παρατηρήθηκε καθόλου

αύξηση του αρχικού αριθμού, αλλά σταθερή μείωση. Αυτό το γεγονός μας δείχνει την κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος στα κύτταρα του μελανώματος παρόλο που έρευνες έχουν δείξει πλήρη ασφάλεια και καθόλου τοξικότητα του σε ποντίκια έως και 600mg/kg/day<sup>142</sup>, και τη μη τοξικότητα των 150μg/mL (ποσότητα που χρησιμοποιήσαμε σε αυτό το πείραμα) σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα<sup>119</sup>.

Αντίστοιχα με τα M5 κύτταρα στο Διάγραμμα 17 φαίνεται η αναστολή της ανάπτυξης στα A375 που ορίζεται στο 60% στις 48 h και στο 75% στις 72 h. Ποσοστά που θεωρούνται στατιστικά σημαντικά με στάθμη σημαντικότητας 99,9%, όπου  $p < 0,001$  (Πίνακας 26).

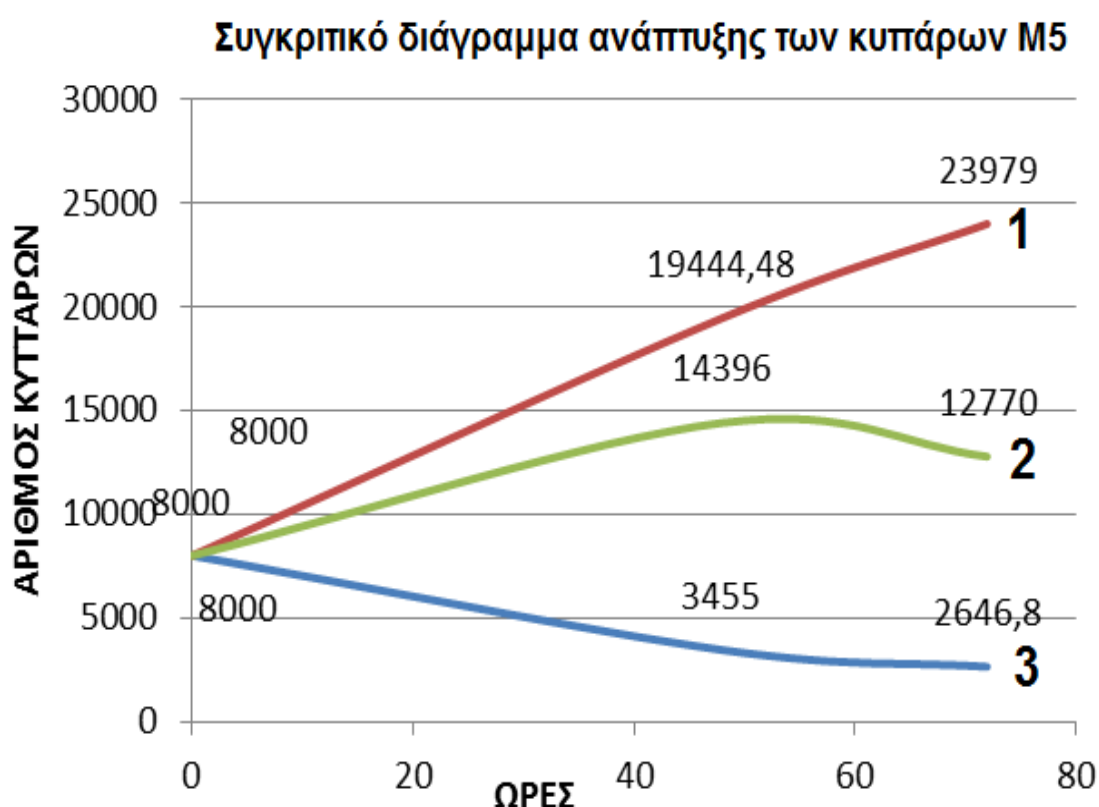
Παραπάνω αναφέραμε ότι παρότι βλέπουμε τα M5 να υπερέχουν σε ποσοστό αναστολής σε σχέση με τα A375 το paired t test δείχνει ότι τα A375 έχουν επηρεαστεί σημαντικότερα από τα M5 στην παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού για 48 h. Το p value των A375 στις 48 h είναι  $t = 0,0049$  (Πίνακας 26) ενώ των M5 είναι  $t = 0,01$ .

**Πίνακας 26** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα A375 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ των κυττάρων αναφοράς (C) και των κυττάρων παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/mL (A). Στις 48h (A375C48-A375A48) και 72h (A375C72-A375A72).

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A375C48	3	17928,21	221,7776	384,13	16973,98	18882,45
A375A48	3	7550,35	911,1494	1578,157	3629,991	11470,71
diff	3	10377,86	729,9774	1264,358	7237,024	13518,7
Mean (diff) = mean (A375C48-A375A48)				t= 14,2167		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0049						
Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A375C72	3	19614,08	415,7816	720,1548	17825,12	21403,04
A375A72	3	5067,843	374,2985	648,304	3457,367	6678,32
diff	3	14546,24	44,19309	76,54467	14356,09	14736,38
Mean (diff) = mean (A375C72-A375A72)				t=14736,38		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0				Ha: mean(diff) != 0		
Pr(  T   >   t  ) = 0,0000						

### 13.5 Σύγκριση πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού και ολικού εκχυλίσματος ροδιού.

Τέλος στα Διαγράμματα 19 και 20 φαίνεται συγκριτικά η επί τοις 100 (%) επιβίωση των M5 και A375 κυττάρων, που προκλήθηκε από το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού και το απλό εκχύλισμα ροδιού. Παρατηρείται ότι τόσο το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού και το ολικό εκχύλισμα ροδιού μειώνουν σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων.

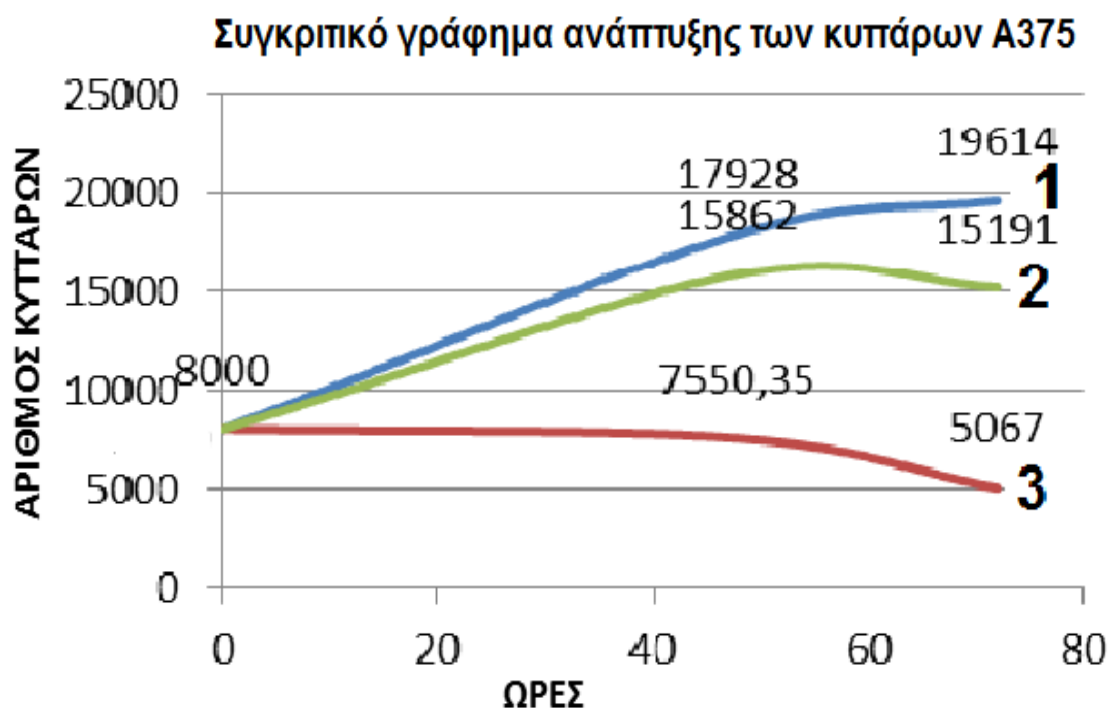


**Διάγραμμα 19.** Συγκριτική απεικόνιση των καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων M5. (1) Απουσία PFE, (2) παρουσία ολικού PFE και (3) παρουσία μόνο PFE.

Το υπολογιστικό πρόγραμμα stata/ SE 12.0, δείχνει πως το ολικό εκχύλισμα δεν έχει στατιστικά σημαντική αναστολή σε σχέση με το μάρτυρα στις 48 h στα κύτταρα M5 (Πίνακας 27), όμως έχει στατιστικά σημαντική αναστολή στις 72 h(Πίνακας 28).

**Πίνακας 27.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα M5 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ κυττάρων αναφοράς(C) και κυττάρων παρουσία ολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/mL(B). Στις 48h (M5C48-M5B48) και 72h (M5C72-M5B72).

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
M5C48	3	19444,48	1967,272	3407,425	10979,99	27908,96
M5B48	3	14396,01	757,3996	1311,855	11137,19	17654,84
diff	3	5048,463	2661,581	4609,994	-6403,396	16500,32
Mean (diff) = mean (M5C48-M5B48)		t=1,8968				
Ho: mean (diff) = 0		degrees of freedom=2				
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0				
Pr( T  >  t ) = 0,1983						
Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
M5C72	3	23978,34	1302,967	2256,805	18372,13	29584,55
M5B72	3	12770,32	717,8653	1243,379	9681,591	15859,04
diff	3	11208,02	663,0368	1148,413	8355,206	14060,84
Mean (diff) = mean (M5C72-M5B72)		t=16,9041				
Ho: mean (diff) = 0		degrees of freedom=2				
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0				
Pr( T  >  t ) = 0,0035						



**Διάγραμμα 20.** Συγκριτική απεικόνιση των καμπυλών ανάπτυξης των κυττάρων A375. (1) Απουσία PFE, (2) παρουσία ολικού PFE και (3) παρουσία μόνο PFE.

Στα A375 το ολικό προκύπτει ότι το εκχύλισμα ροδιού προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης και στις 48 h (Πίνακας 28) και στις 72 h (Πίνακας 29). Από τις καμπύλες των Διαγραμμάτων 19 και 20 φαίνεται καθαρά ότι μεγαλύτερη αναστολή προκαλείται από τις πολυφαινόλες και όχι από το ολικό εκχύλισμα.

**Πίνακας 28** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα A375 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ των κυττάρων αναφοράς(C) και των κυττάρων παρουσία ολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/mL(B). Στις 48h (A375C48-A375B48).

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A375C48	3	17928,21	221,7776	384,13	16973,98	18882,45
A375B48	3	15862,99	249,8406	432,7366	14788,01	16937,96
diff	3	2065,227	142,9179	247,5411	1450,3	2680,153
Mean (diff) = mean (A375C48 – A375B48)				t=14,4504		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff)< 0		Ha: mean(diff) != 0				
Pr( T  >  t ) = 0,0048						

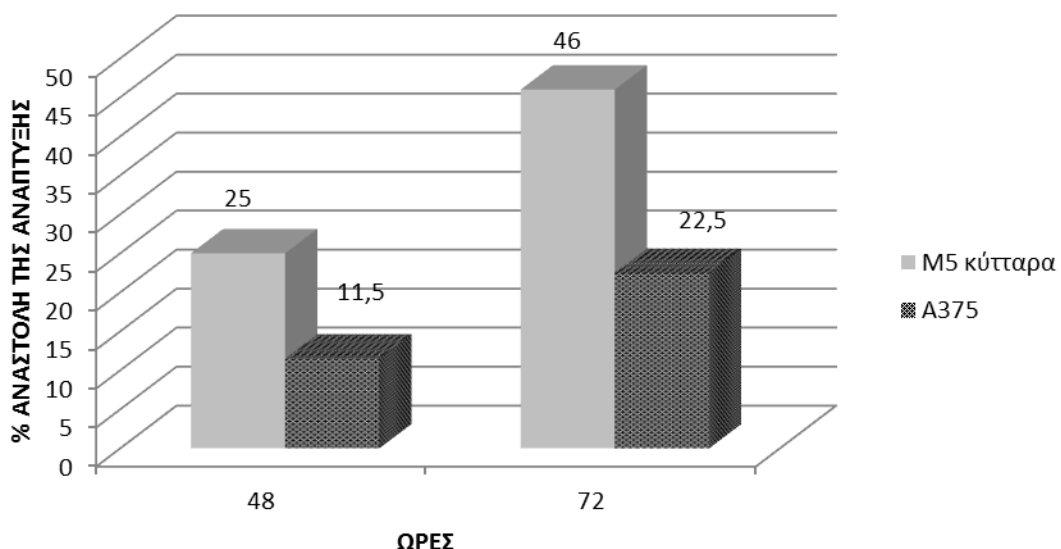
**Πίνακας 29.** Στατιστικά στοιχεία σύγκρισης τιμών με paired t test στα A375 κύτταρα μελανώματος. Στατιστική σύγκριση μεταξύ κυττάρων αναφοράς(C) και κυττάρων παρουσία ολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/mL(B). Στις και 72h (A375C72-A375B72).

Paired t test						
Variable	Obs	Mean	Std.Err	Std.Dev	Conf. Intervall	
A375C72	3	19614,08	415,7816	720,1548	17825,12	21403,04
A375B72	3	15191,51	133,6793	231,5393	14616,34	15766,69
diff	3	4422,567	458,5994	794,3174	2449,373	6395,761
Mean (diff) = mean (A375C72 – A375B72)				t=9,6436		
Ho: mean (diff) = 0				degrees of freedom=2		
Ha: mean(diff) < 0		Ha: mean(diff) != 0				
Pr( T  >  t ) = 0,0106						

Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση, ότι δηλαδή, οι πολυφαινόλες πρέπει να είναι υπεύθυνες για την θεραπευτική δράση του ροδιού έναντι στον καρκίνο. Παρατηρείται ότι χορήγηση πολυφαινολών μειώνει τον αριθμό των κυττάρων μέχρι 80% (Διάγραμμα 15) και προκαλεί κυτταρικό θάνατο έως και 67% (Διάγραμμα 16). Αντίθετα, η χορήγηση ολικού εκχυλίσματος προσεγγίζει μόνο το 46% όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 21.



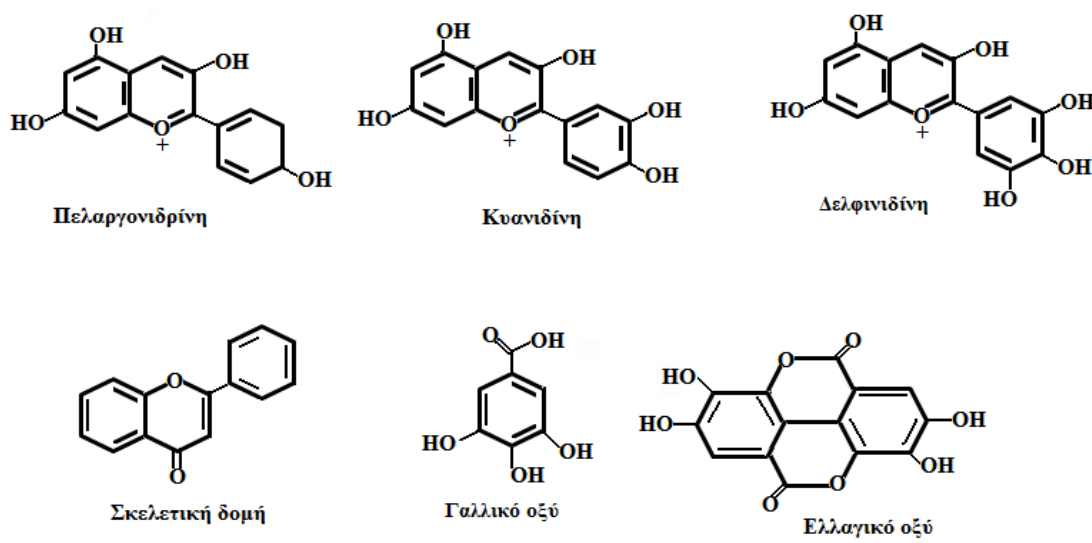
## Αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων παρουσία ολικού εκχυλίσματος ροδιού



**Διάγραμμα 21.** Επί τοις εκατό αναστολή, που προκλήθηκε στα κύτταρα M5 (γκρι) και A375 (μοτίβο μαύρο) από το ολικό εκχύλισμα του ροδιού.

Για να ερμηνευθεί αυτή η αντίφαση θα πρέπει να εξετάσουμε προσεκτικά τη χημική δομή των πολυφαινολών, ώστε να φανεί ο μηχανισμός επίδρασης σε βιολογικό χημικό στάδιο.

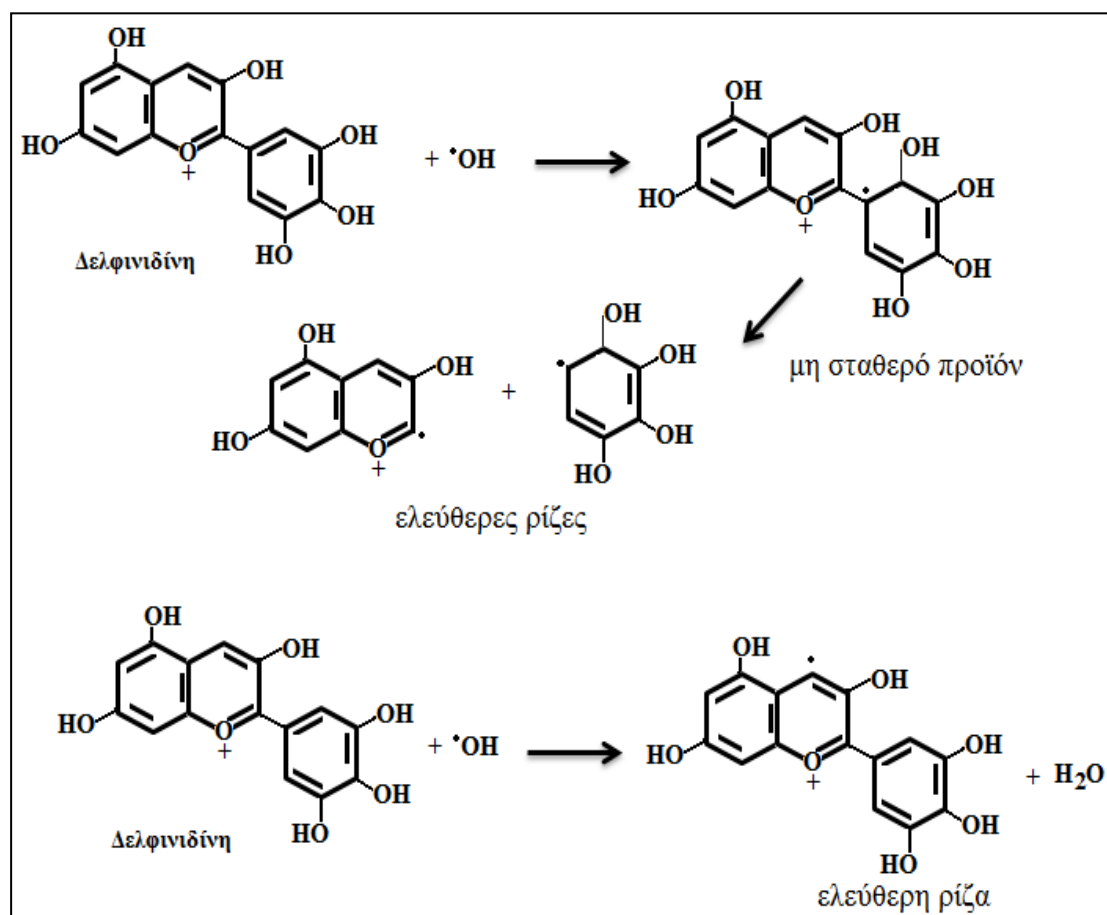
### Πολυφαινολικές ενώσεις του χυμού ροδιού



**Εικόνα 11.** Μοριακοί τύποι των πολυφαινολών στο χυμό του ροδιού (πολυφαινόλες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση).

Στην Εικόνα 11 φαίνονται τα μόρια των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο χυμό ροδιού. Παρατηρείται ότι ο βασικός κορμός των πολυφαινολών αποτελείται από βενζολικούς δακτυλίους και ομάδες υδροξυλίου. Η ιοντική μορφή του ατόμου του οξυγόνου προκαλεί αστέθεια στο μόριο των πολυφαινολών, κυρίως αν βρεθούν σε περιβάλλον αναγωγικό.

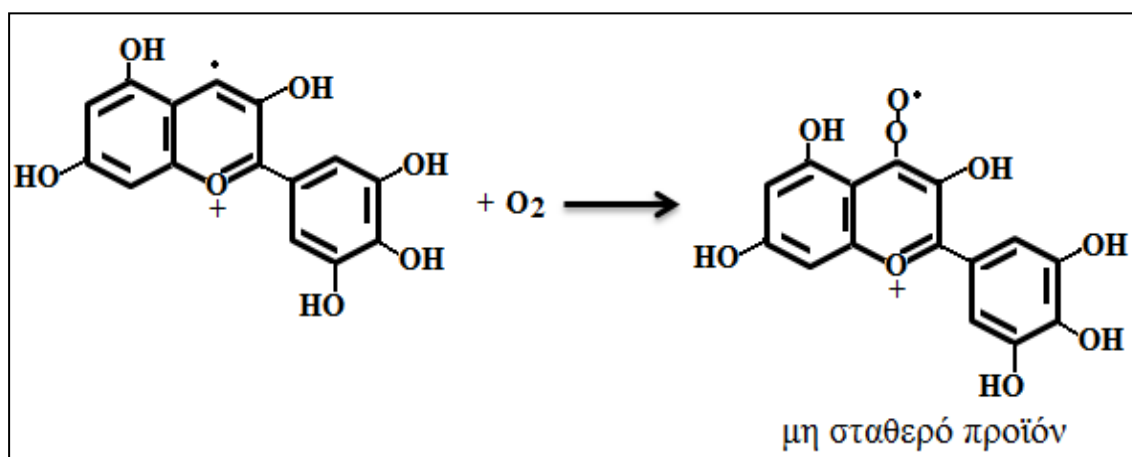
Λαμβάνοντας υπόψη ότι τόσο κατά την έναρξη ανάπτυξης του καρκίνου, όσο και κατά την εξέλιξή του φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες επιδρά στον ασθενή. Κατά το οξειδωτικό στρες παράγονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), άτομα υδρογόνου (ελεύθερες ρίζες υδρογόνου,  $\text{H}$ ) και ηλεκτρόνια ( $e^-$ ). Είναι γνωστό από τη χημεία των ελευθέρων ριζών ότι οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου δίνουν αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς  $\text{C}=\text{C}$  και απόσπαση ατόμων υδρογόνου από τις οργανικές ενώσεις. Οι αντιδράσεις αυτές συνήθως δεν παρουσιάζουν επιλεκτικότητα, με την έννοια ότι όλες οι αντιδράσεις μπορούν να λάβουν χώρα συγχρόνως<sup>143</sup>.



**Εικόνα 12.** Σχηματική παράσταση των αντιδράσεων των πολυφαινολών με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου

Οι πολυφαινόλες διαθέτουν πολλούς διπλούς δεσμούς στο μόριό τους με αποτέλεσμα να μπορούν να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου με προσθήκη στους διπλούς δεσμούς.

Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες των φαινολών παρουσία οξυγόνου σχηματίζουν υπεροξειδία τα οποία τελικά οδηγούν σε σχάση των δακτυλίων, ως μη σταθερά προϊόντα.



Εικόνα 13. Παράγωγα πολυφαινολών

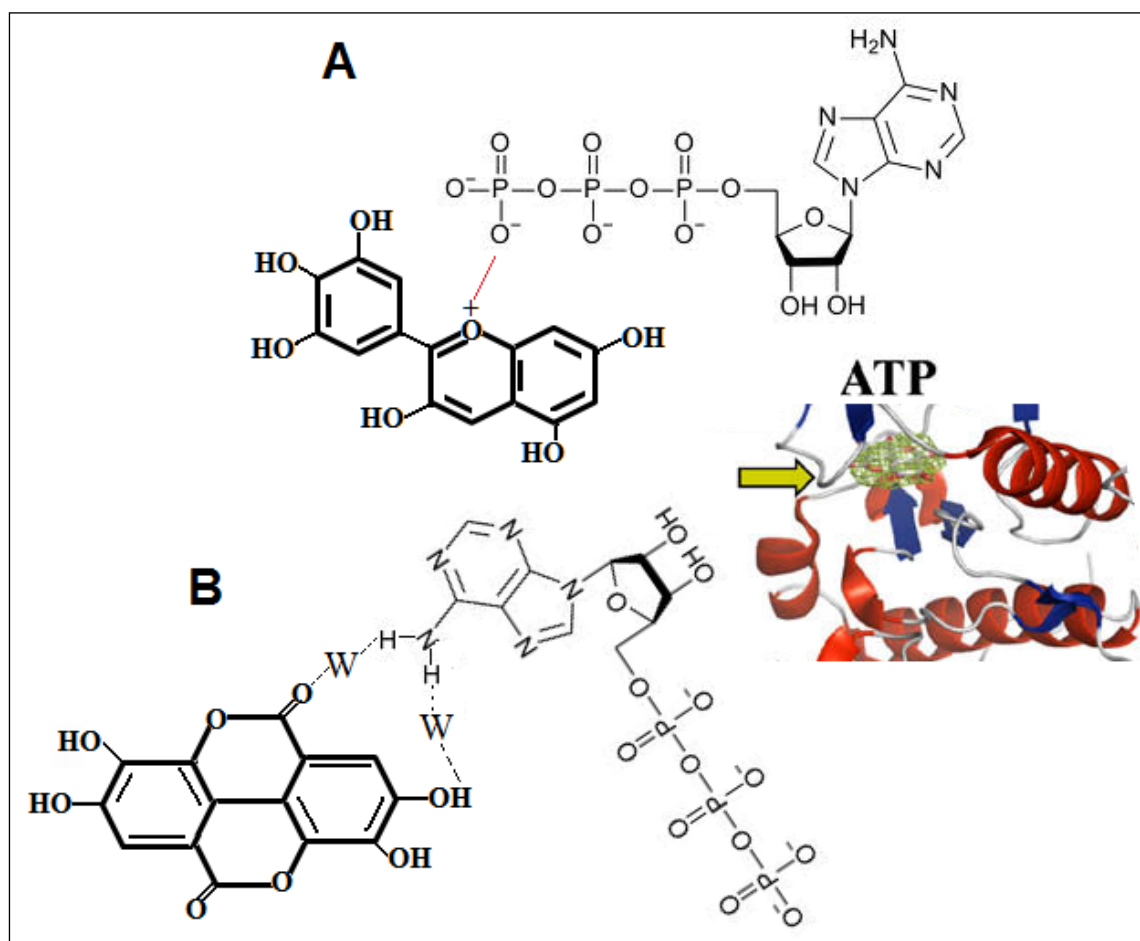
Όμως σε ανόξυ συνθήκες οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες είτε αντιδρούν μεταξύ τους παρέχοντας διμερή προϊόντα, είτε διασπώνται προς άλλα προϊόντα. Τα παραγόμενα όμως προϊόντα αρχίζουν να συμμετέχουν στη βιολογική χημεία, μειώνοντας έτσι το τελικό αποτέλεσμα. Από την παρατήρηση ότι οι πολυφαινόλες οδηγούν σε τοξικότητα φαίνεται ότι τα προϊόντα που παράγονται από τη σχάση των κυκλικών δακτυλίων πρέπει να παράγονται ελεύθεροι βενζολικοί δακτύλιοι, που ως γνωστό είναι τοξικοί.

Από την άλλη πλευρά τα μόρια των πολυφαινολών περιέχουν ομάδες OH, οι οποίες συμπεριφέρονται ως αναγωγικοί παράγοντες. Αυτό σημαίνει ότι τα οξειδωμένα προϊόντα μπορούν να επανασχηματισθούν από τη μεταφορά ατόμου υδρογόνου (H) προς τις ενώσεις από τις οποίες είχαν αποσπασθεί. Η παρουσία στα μόρια της πελαργονιδρίνης και δελφινιδίνης κατιόντων οξυγόνου δικαιολογεί τη μεταφορά ηλεκτρονίων προς τα μόρια. Κατά την αναγωγή του οξυγόνου διαταράσσεται η ισορροπία του μορίου και επομένως επέρχεται σχάση των δεσμών C=O.

Η παραδοχή ότι οι πολυφαινόλες πρέπει να δρουν με μηχανισμό ελευθέρων ριζών ενισχύεται και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αναφέρεται

στην βιβλιογραφία ότι ικατά την ακτινοβόληση πολυφαινολών από πράσινο τσαΐ η αντιβακτηριακή απόδοση αυξάνει<sup>144</sup>. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν επίσης ότι οι πολυφαινόλες έχουν διπλό ρόλο στην αντικαρκινική δράση των κυττάρων. Φαίνεται δηλαδή ότι αφενός μεν αυξάνει την αντικαρκινική δράση στις σειρές των καρκινικών κυττάρων M5 και A375, αφετέρου προστατεύουν τα υγιή κύτταρα.

Η αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών στις σειρές των καρκινικών κυττάρων M5 και A375 θα πρέπει να γίνεται μέσω σύνδεσης των φαινολών με το ATP των κυττάρων. Βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>145,146</sup> αναφέρουν ότι τα υδροξύλια, ή και οι κετο- ομάδες των φαινολών μπορούν να αντιδράσουν με δεσμούς υδρογόνου με το ATP, μέσω των μορίων νερού ενυδάτωσης. Επίσης τα θετικά ιόντα των πολυφαινολών μπορούν να αντιδράσουν ιοντικά με τις φωσφορικές ομάδες του ATP. Οι δυνατές συνδέσεις δίνονται στην Εικόνα 14:



**Εικόνα 14.** Σχηματική παράσταση της σύνδεσης της πολυφαινόλης με το ATP της p38. A: ιοντική σύνδεση και B: με δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων νερού.

Η προστασία των υγιών κυττάρων φαίνεται να αναπτύσσεται ακόμη και από την τοξικότητα έναντι της χημειοθεραπείας.

#### **14. ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ p38α MAP ΚΙΝΑΣΗΣ.**

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της ανθεκτικότητας του μελανώματος και των άλλων καρκίνων με την παρουσία της p38α<sup>146,147</sup>. Το ένζυμο αυτό, λαμβάνει μέρος σε ένα πολυενζυμικό κυτταρικό στάδιο (μονοπάτι) μεταγωγής σήματος, το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Το στάδιο αυτό ονομάζεται το *μονοπάτι των MAP κινασών*. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται μέσω ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων διαφορετικών ενζύμων. Στο τέλος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος βρίσκεται η p38 MAP κινάση. Το ένζυμο αυτό (p38 MAP κινάση) φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες, και έχει τέσσερις ισομορφές (α, β, γ, δ).

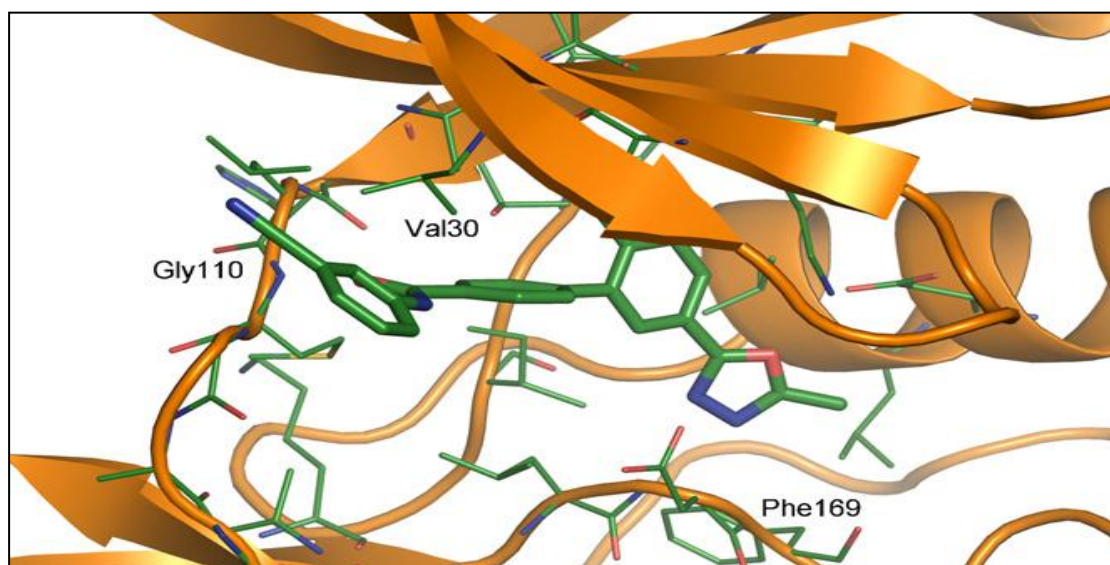
Στα αποτελέσματα των πειραμάτων σχετικά με τα sbcl1 κύτταρα αναφέρονται αναλυτικά τα δεδομένα που προέκυψαν, τα οποία δείχνουν ότι η συμπεριφορά των κυτταρικών μας σειρών ως προς την ανάπτυξή τους, είναι ανάλογη με τη συμπεριφορά άλλων κυτταρικών σειρών που οδηγούνται σε απόπτωση ή πολλαπλασιασμό μέσω της p38 MAP κινάση. Αυτός είναι και ο λόγος μας οδήγησε στην παράλληλη μελέτη των κυτταροκαλλιιεργιών και της p38 MAP κινάσης και ιδιαίτερα την ισομορφή α του παραπάνω ενζύμου.

Επίσης, στα προηγούμενα πειράματα αποδείχθηκε ότι παρουσία σαλικυλικού νατρίου 20mM η ποσότητα της p38MAPκινάσης αυξάνεται στα κύτταρα sbcl1. Για συγκέντρωση σαλικυλικού νατρίου 5mM και θεοφυλλίνης 1mMη ποσότητα της p38MAPκινάσης μειώνεται. Τα αποτελέσματα αυτά συνδέονται άμεσα με τα αποτελέσματα απόπτωσης των sbcl1 κυττάρων μελανώματος (σελ. 56).

Παρ' όλα αυτά, περεταίρω αύξηση των ποσοτήτων της p38 MAPκινάσης, δεν συνεπάγεται απαραίτητα και φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται παρακάτω στο μονοπάτι της απόπτωσης. Αντίθετα, φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η αύξηση της ποσότητας της φωσφορυλιωμένης p38 κινάσης στα sbcl1 κύτταρα μελανώματος, παρουσία

σαλικυλικού οξέος, να οφείλεται σε ένα εσωτερική ανάδραση (feedback) της κυτταροπροστασίας<sup>148</sup>. Φαίνεται δηλαδή, ότι όσο το σαλικυλικό νάτριο αναστέλλει τη δράση της p38MAPκινάσης σε κάποιο επίπεδο του μεταγωγικού μονοπατιού των MAPκινασών, τόσο το καρκινικό κύτταρο προσπαθεί να επαναφέρει την ισορροπία του. Αυτό πιστεύουμε ότι μπορεί να γίνει είτε επάγοντας την παραγωγή του ενζύμου, είτε αυξάνοντας τη φωσφορυλίωσή του. Θα πρέπει να τονισθεί ότι στις μετρήσεις των παραπάνω πειραμάτων υπολογίζεται η ολική φωσφορυλιωμένη p38MAPκινάση και επομένως δεν είναι δυνατή η διάκριση του ποσοστού συμβολής της ισομορφής α μέσα στο σύνολο. Επομένως, είναι φυσικό να προκύπτει διαφορά μεταξύ των δύο αυτών αποτελεσμάτων μεταξύ των μετρήσεων p38 MAPκινάσης σε κύτταρα μελανώματος sbcl1 και πείραμα ανίχνευσης αναστολής της p38αMAPκινάσης.

Μετά από τις παραπάνω παρατηρήσεις, δημιουργείται εύλογα το ερώτημα κατά πόσο αυτές οι πολυφαινόλες, το σαλικυλικό νάτριο και οι υπόλοιπες ουσίες αναστέλλουν ή όχι την ισομορφή α της p38 MAPκινάσης. Είναι χρήσιμο επίσης να διευκρινισθεί ότι στα πλαίσια ενός πλήρους κυτταρικού συστήματος, δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν άμεσα κατά πόσο οι μελετούμενες ενώσεις επηρεάζουν την p38αMAPκινάση, αφού οι μηχανισμοί σε επίπεδο κυττάρου φαίνεται να είναι περισσότεροι του ενός και δυστυχώς με τις μέχρι σήμερα ισχύουσες τεχνικές δεν μπορούν να είναι εύκολα διακριτοί μεταξύ τους.



**Εικόνα 15.** Δραστικές θέσεις του ενζύμου p38α<sup>149</sup>.

Για τον λόγο αυτό και προκειμένου να δούμε τον ρόλο του παραπάνω ενζύμου (p38α), σχεδιάσαμε πειράματα, έτσι ώστε οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες να επιδράσουν άμεσα με το ένζυμο και να δούμε αν έχουν επίδραση στην φωσφορυλιωτική του ικανότητα. Για να επιτευχθεί ο στόχος παράλληλα με την καταχώρηση της ανάπτυξης των κυττάρων ελέγχθηκε και η φωσφορυλιωτική ικανότητα της p38αMAPκινάση. Για το σκοπό αυτό προστέθηκαν στα συστήματά μας 150μg/ml πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδίου (PFE), 5mMσαλικυλικού νατρίου (SA5), 20mMσαλικυλικού νατρίου (SA20), 1mM θεοφυλλίνη (THEO), 150μg/ml δελφινιδίνη (Delph), 10mM καφεϊκού οξέος(CAFF) και 1mM ακετυλοσαλικυλικού νατρίου (ASA).

Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα ως δείκτης της ενεργότητας της p38αMAPκινάσης επιλέχθηκε το ATF-2<sup>150</sup>, δηλαδή ένας μεταγραφικός παράγοντας, που φωσφορυλιώνεται από την p38α στη θρεονίνη 71. Έχοντας λοιπόν σαν υπόστρωμα το ATF-2, μελετάται η μείωση της φωσφορυλίωσής του, ώστε να αξιολογηθεί η δράση του ενζύμου που μας ενδιαφέρει. Ως μάρτυρα ειδικής αναστολής της p38α επιλέχθηκε η πυριδινυλοϊμιδαζόλη SB202190, βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων. Η συγκέντρωση του 2μM ορίστηκε γιατί άλλες έρευνες δείχνουν ότι τα 2μM είναι ικανά να προκαλέσουν την ίδια απόπτωση μέσω του μονοπατιού της p38 όση και τα 20μM.

Το SB202190 είναι επιλεκτικός αναστολέας και της p38α και της p38β, μπορεί να αναστείλει και τις δύο ισομορφές του ενζύμου<sup>88</sup>, καθώς ανταγωνίζεται το ATP. Το γεγονός ότι αναστέλλει και την p38β δεν θεωρείτε ανασταλτικός παράγοντας για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος καθότι έχουμε μόνο την παρουσία της p38α, γεγονός που διασφαλίζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Για να αξιολογήσουμε το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολήστου ενζύμου p38αMAP κινάση, θεωρήσαμε το ποσοστό φωσφορυλίωσης του ATF-2 από την p38αMAP κινάση, απουσία ουσιών, ως το 100% της φωσφορυλιωτικής ικανότητας της p38α στις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος.

Στη συνέχεια, ορίσαμε τα ποσοστά φωσφορυλίωσης παρουσία των πειραματικών ουσιών και αφαιρώντας από το 100% ορίσαμε την αναστολή όπως φαίνεται και στον παρακάτω Πίνακα 30.

**Πίνακας 30.** Αναστολή της δράσης της p38α απουσία και παρουσία πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/ml (PFE), του σαλικυλικού νατρίου 20mM και 5mM (SA20 και SA5), του ακετυλοσαλικυλικού (ASA) 1mM, της δελφινιδίνης (DELPH) 150μg/ml, της θεοφυλλίνης (THEO) 1mM και του καφεϊκού οξέος (CAFFEIC).

Ουσίες	p	Substance/p 38	ATF-2(A) Φωσφορυλ ίωση	% Αναστολή p38α (100-A)
<b>p38 – p38</b>	-	1.000000	100.0	-
<b>p38 – SB</b>	0,000	0.488362	48.84	51.16
<b>p38 – PFE</b>	0,000	0.456869	45.69	54.31
<b>p38 - SA20</b>	0,001	0.565267	56.53	43.47
<b>p38 - SA5</b>	0,003	0.689639	68.96	31.04
<b>p38 – ASA</b>	0,005	0.716568	71.66	28.34
<b>p38 - DELF</b>	0,000	0.553857	55.39	44.61
<b>p38 - THEO</b>	0,029	0.803286	80.33	19.67
<b>p38 - CAFF</b>	0,001	0.604290	60.43	39.57

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 30, η αναστολή που προκαλεί το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού (150μg/ml), που έχει απομονωθεί με τρόπο όπως προαναφέρθηκε στα αρχικά πειράματα, εμφανίζει τη μεγαλύτερη αναστολή. Μάλιστα η αναστολή του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού είναι ακόμη μεγαλύτερη αυτής που προκαλεί ο γνωστός αναστολέας SB202190 (20μM), καθώς και από το σαλικυλικό νάτριο 20mM, που στα πειράματα κυτταροκαλλεργιών οδηγεί σε στατιστικά σημαντική απόπτωση των κυττάρων μελανώματος sbcl1 (Πίνακας 30). Από τα συγκριτικά αποτελέσματα του Πίνακα 1 οδηγούμαστε στο ενθουσιώδες συμπέρασμα ότι το φυτικής προέλευσης πολυφαινολικό διάλυμα, μάλιστα δε χωρίς ουδεμία πρόσθεση χημικών, ουσιών υπερβαίνει σε ισχύ γνωστές χημικές αντικαρκινικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα. Ας τονισθεί ότι η αναστολή του πολυφαινολικού διαλύματος ροδιού υπερβαίνει ακόμη και αυτής του πλέον αναγνωρισμένου αναστολέα του ενζύμου p38α, το SB202190.



**Πίνακας 31.** Στατιστικά δεδομένα αναστολής p38α από πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού 150μg/ml (PFE), του σαλικυλικού νατρίου 20mM και 5mM (SA20 και SA5), του ακετυλοσαλικυλικού (ASA) 1mM, της δελφινιδίνης (DELPH) 150μg/ml, της θεοφυλλίνης (THEO) 1mM και του καφεϊκού οξέος (CAFFEIC) 10mM.

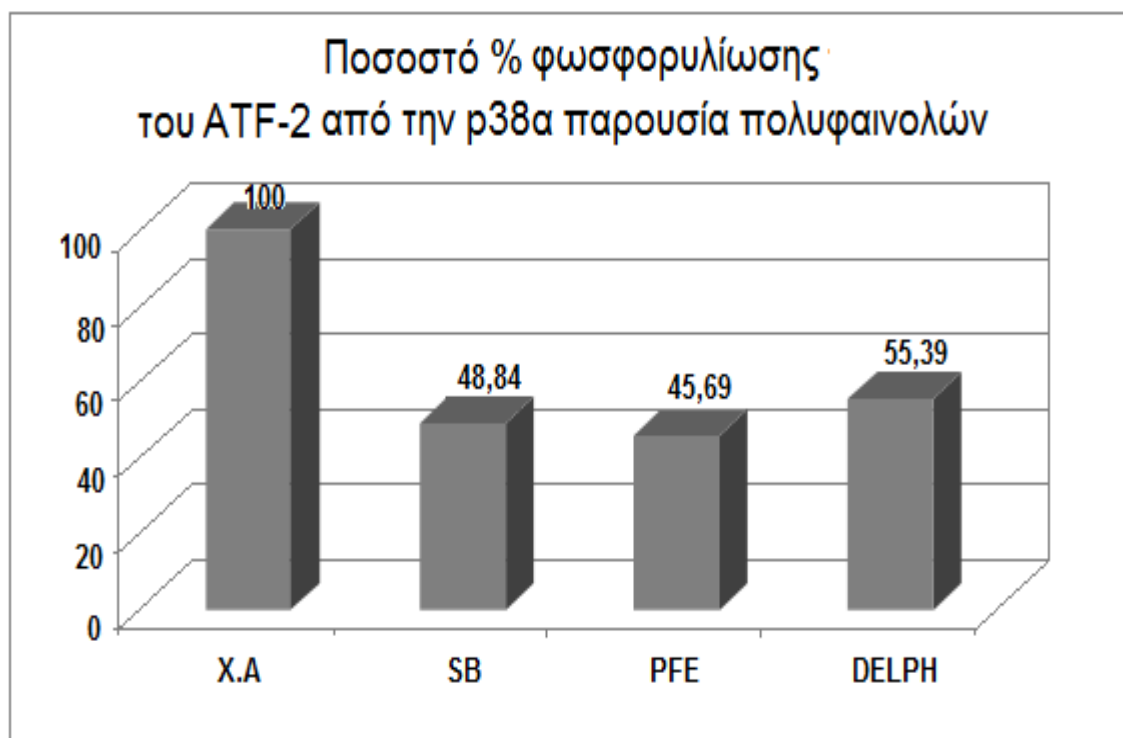
Ζεύγη	Std. Deviation	T	df	P value
p38 – SB	126,70	5,596	9	,000
p38 – PFE	119,72	6,287	9	,000
p38 - SA20	114,26	5,272	9	,001
p38 - SA5	106,93	4,022	9	,003
p38 – ASA	107,57	3,651	9	,005
p38 - DELF	109,23	5,660	9	,000
p38 - THEO	105,46	2,585	9	,029
p38 - CAFF	110,59	4,958	9	,001

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος IBMSPSSStatisticsVersion1.9 (Πίνακας 31), ορίστηκε η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων. Επειδή ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλούν οι ενώσεις εκείνες που μπορούν να δράσουν ως εκλεκτικοί αναστολείς της p38α MAP κινάσης, ορίζουμε στατιστική σημαντικότητα με στάθμη εμπιστοσύνης 99,9%. Επομένως, το SB202190 2μM, το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιούροδιού (PFE)150μg/ml, το σαλικυλικόνάτριο (SA20) 20mM, 150μg/ml δελφινιδίνη (Delph) και το καφεϊκό οξύ (CAFF)10mMείναι ειδικοί αναστολείς της p38α με  $pvalue < 0,001$ . Τέλος, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 31, η θεοφυλλίνη 1mMδεν προκαλεί τόσο στατιστικώς σημαντική ανασταλτική δράση (εκλεκτικότητα αναστολέα) στην p38α MAP κινάση καθώς εμφανίζει  $pvalue < 0,05$ .

#### **14.1 Δράση του πολυφαινολικού διαλύματος και της δελφινιδίνης στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α.**

Προκειμένου να δούμε την επίδραση στο ποσοστό φωσφορυλίωσης που προκαλείται στον ATF-2 μεταγραφικό παράγοντα από την p38α παρουσία

πολυφαινολών από εκχύλισμα ρόδιου 150μg/ml (PFE) και δελφινιδίνη καταστρώθηκε το Διάγραμμα 22.



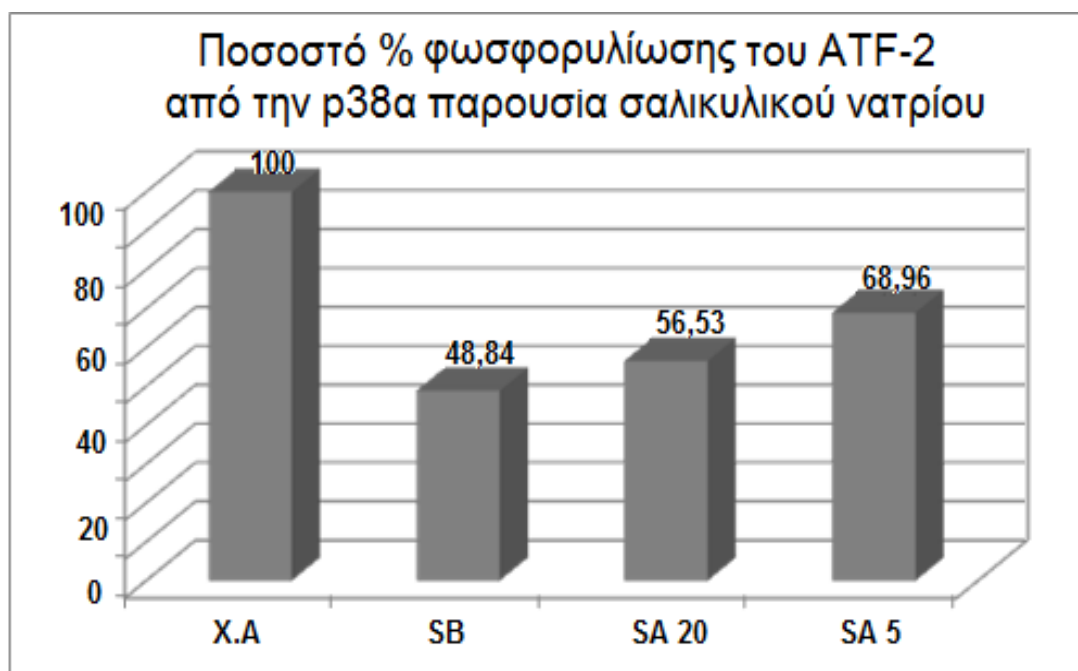
**Διάγραμμα 22.** Συγκριτικά αποτελέσματα φωσφορυλίωσης του ATF-2 προκαλούμενη από πολυφαινολικό εκχύλισμα ρόδιου 150μg/ml (PFE) και της δελφινιδίνης (DELPH) 150μg/ml σε σχέση με τον μάρτυρα (XA) και τον αναστολέα της p38α, SB202190 (SB) 2μM.

Στο Διάγραμμα 22 φαίνεται η επί τοις εκατό φωσφορυλίωση του AFT-2 μεταγραφικού παράγοντα που προκαλείται από πολυφαινολικό εκχύλισμα ρόδιου 150μg/ml (PFE) και δελφινιδίνη. Η πρώτη στήλη με X.A αντιστοιχεί στην φωσφορυλίωση του ATF-2 χωρίς αναστολέα που, όπως προαναφέρθηκε θεωρείται ως 100%. Από τα διαγράμματα φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση του ATF-2 παρουσία PFE (150μg/ml) προσεγγίζει τις τιμές φωσφορυλίωσης που προκαλεί ο μάρτυρας αναστολής SB202190 20μM. Επίσης από τη σύγκριση φαίνεται ότι το PFE (150 μg/ml) παρουσιάζει μείωση κατά περίπου 10 % ως προς τη δελφινιδίνη (150μg/ml). Αν ληφθεί υπόψη ότι το πολυφαινολικό διάλυμα ρόδιου εμπεριέχει δελφινιδίνη, γίνεται αντιληπτό ότι και οι άλλοι πολυφαινολικοί παράγοντες του εκχυλίσματος συμβάλλουν στην παρεμπόδιση της p38α. Ένας από τους πολυφαινολικούς παράγοντες που βρίσκεται σε μεγάλη περιεκτικότητα στο πολυφαινολικό εκχύλισμα του ροδιού είναι η κυανιδίνη, η οποία μπορεί επίσης να αυξάνει τη δράση του εκχυλίσματος. Τα συμπεράσματα αυτά

ερμηνεύουν γιατί το εκχύλισμα εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα ως προς την απομονωμένη ουσία.

#### 14.2 Δράση του σαλικυλικού νατρίου στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α

Για τη μελέτη του ρόλου του σαλικυλικού νατρίου στην φωσφορυλίωση που προκαλείται στο ATF-2 από την p38α καταστρώθηκε το Διάγραμμα 23.



**Διάγραμμα 23.** Απεικονίζονται τα αποτελέσματα των δύο συγκεντρώσεων του σαλικυλικού νατρίου 20mM (SA20) και 5mM (SA5) σε σχέση με το μάρτυρα (X.A) και τον αναστολέα της p38α , SB202190 2μM.

Στο Διάγραμμα 23 απεικονίζεται το ποσοστό φωσφορυλίωσης του ATF-2 παρουσία σαλικυλικού νατρίου 20mM (SA20) και σαλικυλικού νατρίου 5mM (SA5). Εδώ, φαίνεται καθαρά πως η μικρότερη συγκέντρωση σαλικυλικού νατρίου επιτρέπει περισσότερο τη φωσφορυλίωση του ATF-2 από την p38α, γεγονός που ισοδυναμεί με αδυναμία αναστολής της p38α από το SA5, σε σχέση με την ίδια την ουσία σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (SA20) όπου η φωσφορυλίωση αναστέλλεται σημαντικά. Όπως αναφέρθηκε στα δεδομένα στον Πίνακα 31, με στάθμη εμπιστοσύνης 99,9% η συγκέντρωση των 5mM φαίνεται ότι προκαλεί μη στατιστικά σημαντική αναστολή στην p38α. Αυτό μας

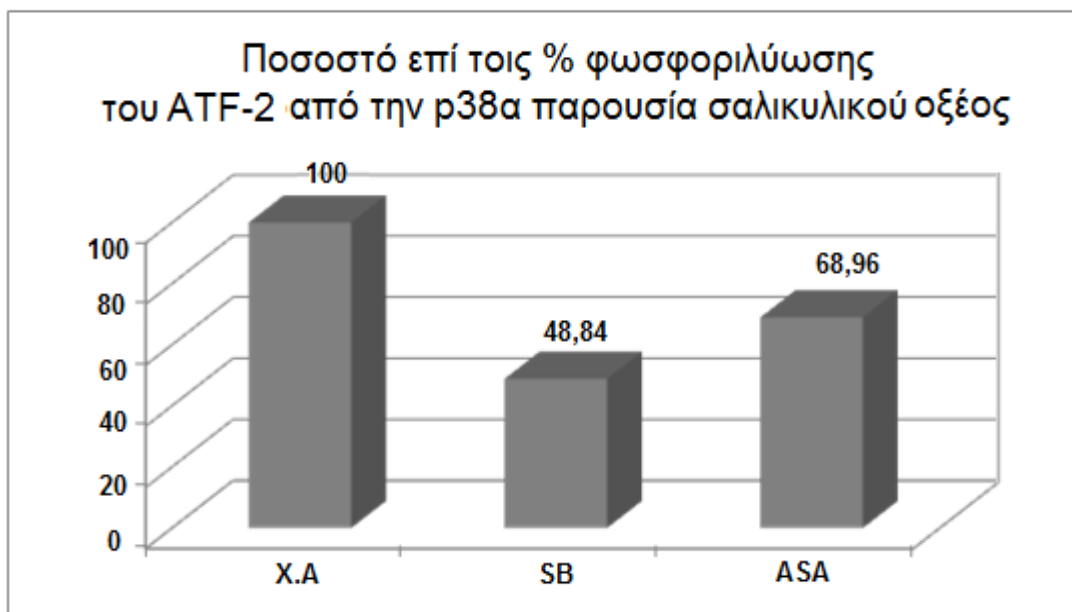
υποδεικνύει αναστολή εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της ουσίας. Πρέπει να τονισθεί ότι η συγκέντρωση του σαλικυλικού νατρίου και όχι μόνο αυτού επηρεάζει το αποτέλεσμα. Αυτή συνεπάγεται ότι τα προϊόντα που παράγονται συμμετέχουν στο σύστημα παρεμποδίζοντας το ένζυμο να λειτουργήσει περαιτέρω.

Αν η παραπάνω πληροφορία σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης μεταφερθεί σε επίπεδο κυτταρικών συστημάτων, θα πρέπει να κατανοηθεί γιατί αύξηση της συγκέντρωσης του σαλικυλικού νατρίου προκαλεί κυτταροτοξικότητα<sup>131</sup>. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων σχετικά με την απόπτωση των κυττάρων, αφού το αποτέλεσμα είναι αθροιστικό.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο γενικό συμπέρασμα ότι αν και μέσα από τη διεθνή βιβλιογραφία ορίζονται ορισμένες συγκεντρώσεις θα πρέπει για κάθε μελετούμενο σύστημα να γίνεται καμπύλη αριστοποίησης των συγκεντρώσεων, ώστε να προσδιορισθεί το κατώφλι ασφάλειας της συγκέντρωσης του σαλικυλικού νατρίου. Ειδικά, σε κυτταρικό επίπεδο θα μπορεί να ελεγχθεί κατά πόσο τα παραγόμενα προϊόντα μεταβολισμού μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά το αποτέλεσμα που προκύπτει. Πολύ δε περισσότερο απαιτείται προσοχή όταν τα δεδομένα πρέπει να αναχθούν σε επίπεδο ανθρωπίνου σώματος.

### **14.3 Δράση άλλων ουσιών στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α MAP κινάση.**

Πέρα από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματά μας, δοκιμάστηκαν και ουσίες που προτείνονται βιβλιογραφικά. Στα Διαγράμματα 24 και 25, έχουμε την απόδοση της φωσφορυλιωτικής ικανότητας της p38α MAP κινάσης, παρουσία της ασπιρίνης (ακετυλοσαλικυλικό οξύ – ASA) 1mM και παρουσία καφεϊκού οξέος (CAFF) 10mM .

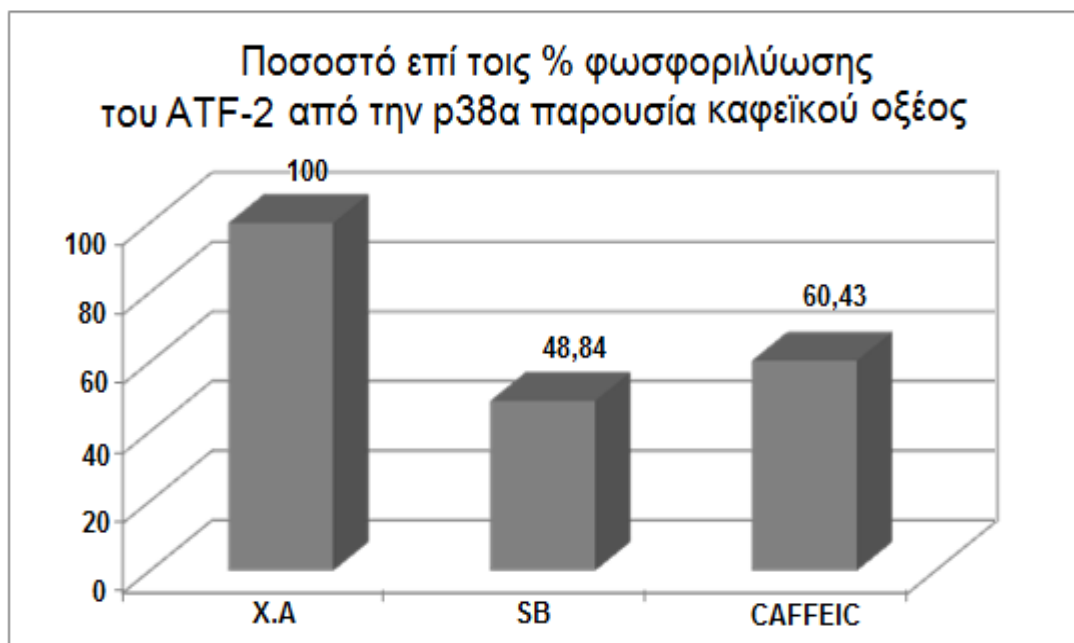


**Διάγραμμα 24.** Απεικονίζεται το ποσοστό της φωσφορυλίωσης το ATF-2 από την p38 παρουσία ακετυλοσαλικυλικού (ASA) 1mM σε σύγκριση με το μάρτυρα (X.A) και τον αναστολέα της p38α SB202190 (SB) 2 μM.

Έχει αποδειχθεί ότι η ασπιρίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των B16 κυττάρων μελανώματος<sup>125</sup>, ακόμα και αν αυτά είναι μεταστατικά, μέσω του μονοπατιού του p38 MAP κινάσης και της JNK (c-junN-terminalKinase). Όμως η αναστολή της JNK οδηγεί σε μείωση των ανασταλτικών αποτελεσμάτων της ασπιρίνης. Προκειμένου να δούμε τον ρόλο της ασπιρίνης χρησιμοποιήθηκε το σαλικυλικό οξύ. Στα *in vitro* πειράματά μας φαίνεται ότι η ασπιρίνη αναστέλλει τη δράση της p38α, όμως δεν προσεγγίζει τη στατιστική απόδοση του 99,9%, καθώς και το p value της υπολογίσθηκε σε 0,005 πολύ μεγαλύτερο του 0,001. Από τα πειραματικά δεδομένα σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα πρέπει να γίνει αποδεκτό ότι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ δρα κυρίως στην JNK και δευτερευόντως στην p38α. Λόγω της μικρότερης δράσης του ακετυλοσαλικυλικού οξέος πάνω στην p38α MAP κινάση, θα πρέπει η απενεργοποίηση του JNK να οδηγεί το κύτταρο σε μικρότερη αποπτωτική ικανότητα, αφού η αναστολή που προκαλεί το ακετυλοσαλικυλικό στην p38α MAP κινάση είναι μικρή.

Το καφεϊκό οξύ<sup>151</sup> αναφέρεται πως επάγει την χημειοευαισθησία κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού, καταφέροντας να επάγει την ποσότητα των TGFβ ακόμα και σε κυτταρική σειρά ανθεκτική σε φάρμακα

χημειοθεραπείας. Πιθανολογείται ότι το καφεϊκό οξύ μέσω ενός μονοπατιού, εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της απόπτωσης.

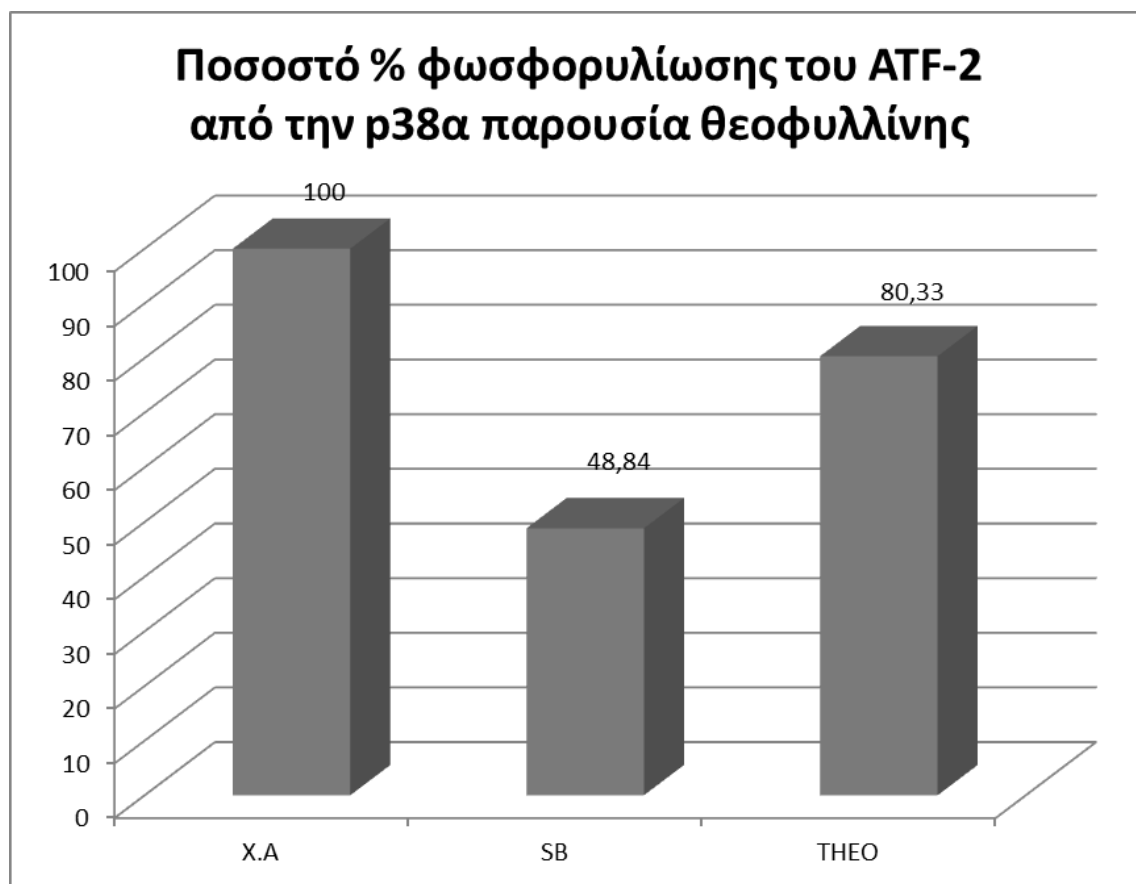


**Διάγραμμα 25.** Απεικονίζεται το ποσοστό φωσφορυλίωσης του ATF-2 από την p38α παρουσία καφεϊκού οξέος (caffeic) 10mM, σε σχέση με τον μάρτυρα (X.A) και το SB202190 (SB) 20μM.

Για το λόγο αυτό προβήκαμε στο πείραμα αυτό, ώστε να διαπιστώσουμε αν η p38α λαμβάνει μέρος στο μονοπάτι αυτό. Τα πειράματά μας δείχνουν πως το καφεϊκό οξύ σε συγκέντρωση 10mM έχει αναστείλει τη δράση της p38α με στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα, αφού η τιμή σημαντικότητας υπολογίσθηκε πολύ μικρότερη του 0,001 ( $pvalue < 0,001$ ). Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνεται ότι στο μονοπάτι, κατά το οποίο εμπλέκεται το καφεϊκό οξύ 10mM και προσδίδει χημειοευαισθησία, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση, είναι αυτό των MAPK και επομένως της p38α MAP κινάση.

#### 14.4 Δράση της θεοφυλλίνης στη φωσφορυλιωτική ικανότητα του ενζύμου p38α

Στο Διάγραμμα 26 φαίνεται ότι η θεοφυλλίνη 1mM δεν επηρεάζει την ικανότητα της p38α MAP κινάσης να φωσφορυλιώνει τον ATF-2 μεταγραφικό παράγοντα, καθώς αγγίζει το 80%.



**Διάγραμμα 26.** Παρουσιάζονται τα ποσοστά φωσφορυλίωσης του ATF-2 από την p38α, παρουσία θεοφυλλίνης 1mM σε σύγκριση με τον αναστολέα SB202190 20μM και τον μάρτυρα (X.A).

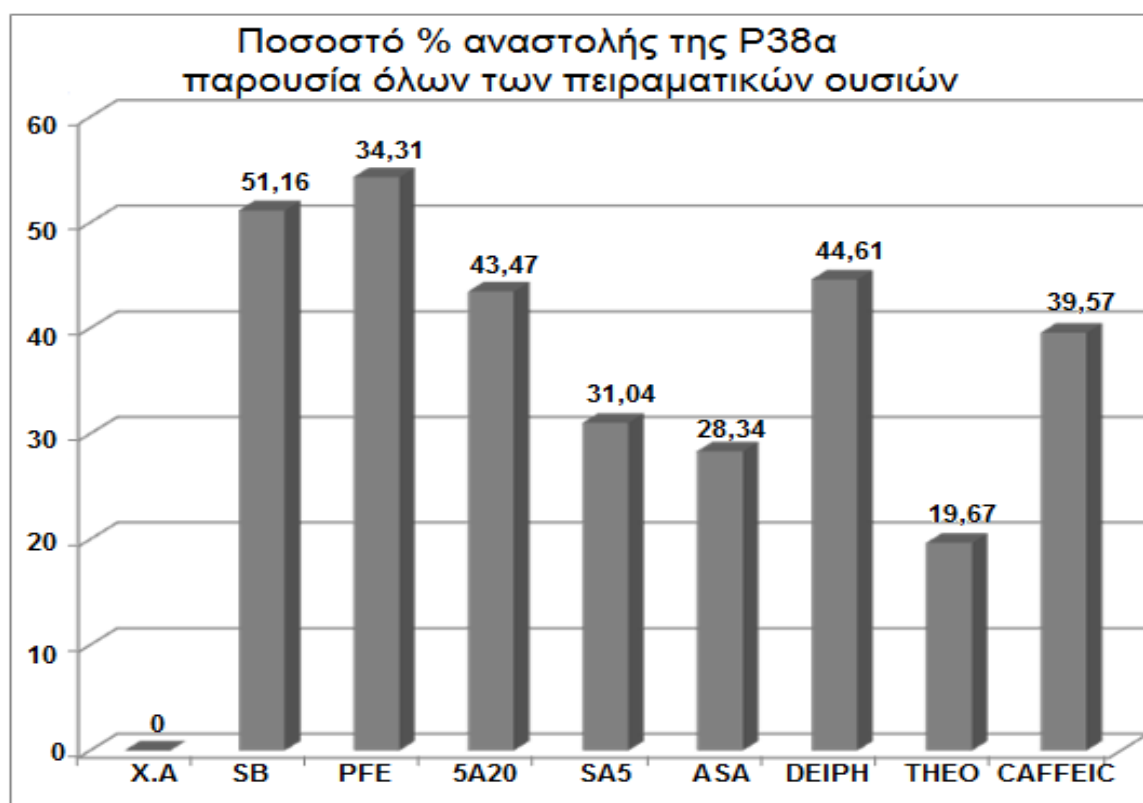
Αυτό το αποτέλεσμα συνδέεται άμεσα με τα αποτελέσματα του πειράματος όπου χρησιμοποιήθηκαν sbcl1 κύτταρα μελανώματος, που φαίνεται πως η θεοφυλλίνη δεν είναι ικανή να φέρει την επιθυμητή απόπτωση στα κύτταρα ρίχνοντας μάλιστα το ποσοστό σε 0% στις 72 h.

Το τεστ στατιστικής σημαντικότητας που φαίνεται στον πίνακα 2 δείχνει πως η θεοφυλλίνη δεν έχει στατιστικά σημαντική δράση με στάθμη εμπιστοσύνης 99,9% αλλά με 95%.

Επίσης σε συνεργασία του ο Steinberg<sup>152</sup>, προτείνει ένα μοντέλο στο οποίο η θεοφυλλίνη αναστέλλει σε επίπεδο DNA αλλά όχι σε επίπεδο πρωτεϊνών και πρωτεϊνικής σύνθεσης.

#### 14.5 Σύγκριση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος με τις υπόλοιπες ουσίες σε σχέση με την επίδρασή τους στην p38α κινάση.

Στο διάγραμμα 27, βλέπουμε μια συνολική απεικόνιση της επί τοις εκατό αναστολής και όχι της φωσφορυλίωσης όπως ήταν στους προηγούμενους πίνακες.



**Διάγραμμα 27.** Συνολική απεικόνιση της ανασταλτικής δράσης του πολυφαινολικού εκχυλίσματος ροδιού 150μg/ml (PFE), του σαλικυλικού νατρίου 20mM και 5mM (SA20 και SA5), του ακετυλοσαλικυλικού (ASA) 1mM, της δελφινιδίνης (DELPH) 150μg/ml, της θεοφυλλίνης (THEO) 1mM και του καφεϊκού οξέος (CAFFEIC) 10mM σε σύγκριση με τον μάρτυρα (X.A) και με τον αναστολέα της p38α, SB202190 (SB) 2μM.

Από τα αποτελέσματα των πειρμάτων είναι πλέον φανερό ότι το πολυφαινολικό εκχύλισμα ροδιού σε συγκέντρωση 150μg/ml αναστέλλει σημαντικά τη δράση της p38α, συγκρινόμενο με τον αναστολέα SB202190



2μM, αλλά και με τις χημικές ουσίες. Επομένως, επιβεβαιώνεται η αρχική παραδοχή, σύμφωνα με την οποία θεωρήθηκε ότι η μεγάλη αναστολή του πολλαπλασιασμού και η απόπτωση που παρατηρήθηκαν και στις τρεις κυτταρικές σειρές μελανώματος (sbcl1, M5, A375) οφείλεται σημαντικά στο πολυφαινολικό εκχύλισμα του ροδιού. Αυτό συμβαίνει γιατί όπως δείχνουν τα παραπάνω αποτελέσματα, οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο εκχύλισμα του ροδιού επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων αρνητικά και μέσω του μονοπατιού των MAPK και συγκεκριμένα της p38α MAP κινάσης προκαλώντας εκλεκτική αναστολή  $p < 0,001$  (Πίνακας 31).

Μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη δράση του ενζύμου p38 MAP κινάσης στην ανταπόκριση του μελανώματος. Όμως, έχει καθοριστεί σε άλλους τύπους καρκίνου ότι ισομερείς μορφές του ενζύμου p38 MAP σχετίζονται με την ανταπόκριση σε διάφορες θεραπευτικές μεθόδους, όπως χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία.

Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία των ισομορφών p38α και p38β κινασών στο αδενοκαρκίνωμα του εντέρου, εμποδίζουν την ανταπόκριση στο χημειοθεραπευτικό σχήμα της ιρινοκετάνης και της 5-φθοροουρακίλης, ένα πολύ διαδεδομένο σχήμα στη θεραπεία της νόσου. Αποδείχθηκε ότι η συγχορήγηση του άνω σχήματος και του SB202190, ενός αναστολέα της p38, αυξάνει την ανταπόκριση στο παραπάνω σχήμα<sup>153</sup>. Η p38α εκτός του αδενοκαρκινώματος του εντέρου βρέθηκε ότι σχετίζεται και με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου<sup>154</sup> (Das 2006). Όσον αφορά στην ακτινοθεραπεία της νόσου, από την έρευνα προτείνεται η p38 ως δείκτης αποτελεσματικής ακτινοθεραπείας στο παραπάνω νόσημα<sup>155</sup>.

Σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα και μελανώματος, κατά τη χορήγηση της cis-πλατίνης ως χημειοθεραπευτικό φάρμακο, παρατηρήθηκε επαγωγή των p38α και p38β<sup>156</sup>. Παρατηρήθηκε όμως ότι συγχορήγηση στους ασθενείς cis-πλατίνης και SB202190 βελτίωσε την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία κατά 63%<sup>157</sup>.

Το γεγονός ότι το φαινολικό εκχύλισμα ροδιού έδειξε την ίδια αναστολή με το SB202190, ανοίγει νέους δρόμους δημιουργίας βελτιωμένων αντικαρκινικών σχημάτων, που θα αποτελούνται από συγχορήγηση φυσικών αναστολέων της p38α με αντικαρκινικά φάρμακα. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει κατ' αρχήν, ότι

οι αναστολείς (φυσικά εκχυλίσματα) που θα χρησιμοποιηθούν προς τούτο, πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας και να περιέχουν κατά το δυνατόν μία μόνο φυσική ένωση, έτσι ώστε να γίνει απόλυτα κατανοητή η δράση της με τα συγχορηγούμενα φάρμακα.

Πρέπει όμως να τονιστεί ότι πριν από τη χρησιμοποίηση των φυσικών ουσιών, όπως π.χ. το εκχύλισμα του ροδιού, που δρουν ανασταλτικά πάνω στην p38α, απαιτείται συστηματική έρευνα, επειδή είναι δυνατόν η σύγχρονη χορήγηση με χημειοθεραπεία να προκαλέσει μεταβολές στο τελικό αποτέλεσμα. Ο Paillas αναφέρει πως διαπίστωσε ότι ο αναστολέας SB202190 επηρεάζει τη δράση ενός άλλου χημειο-θεραπευτικού φαρμάκου της οξαπλατίνης<sup>153</sup>.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Στην παρούσα διατριβή η οποία αφορά τη μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του ροδιού εξήχθηκαν σημαντικά συμπεράσματα, τα οποία συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρονται στην αναστολή που προκαλούν άλλες πολυφαινόλες και ο χυμός του ροδιού. Τα συμπεράσματα μπορούν να συνοψισθούν ως:

- Το πολυφαινολικό εκχύλισμα του ροδιού, διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση 150 µg/mL αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις κυτταρικές σειρές μελανώματος sbcl1, A375 και M5.
- Η αναστολή του πολλαπλασιασμού που προκαλεί το μελετώμενο πολυφαινολικό εκχύλισμα του ροδιού (150 µg/mL) σε χρόνο 72 h είναι παρόμοια με την αναστολή που προκαλεί το σαλικυλικό νάτριο σε συγκέντρωση 20mM.
- Το φαινολικό εκχύλισμα ροδιού (150µg/mL) αναστέλλει την p38α MAP κινάση σε ποσοστό ισοδύναμο με το αντίστοιχο αποτέλεσμα που προκαλεί ο αναστολέας SB202190 στην p38 MAPκινασών.
- Λαμβάνοντας υπόψη τη μοριακή δομή των πολυφαινολών, διαπιστώθηκε ότι η προστατευτική τους δράση βασίζεται: α) Στη δέσμευση τόσο των οξειδωτικών όσο και των αναγωγικών ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό του οργανισμού, παρεμποδίζοντας βλάβες στα υγιή κύτταρα και το DNA, β) Μπορούν να βοηθήσουν στην επιδιόρθωση των προσβλημένων βιολογικών μορίων επιδιορθώνοντας τα κατεστραμένα βιολογικά μόρια.

- Από τα πειράματα φαίνεται ότι η αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών να οφείλεται κυρίως στην άμεση σύνδεση των πολυφαινολών με το ένζυμο p38α MAP κινάση, παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Η δράση με το ένζυμο πρέπει να γίνεται μέσω της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Οι πολυφαινόλες επομένως συμπεριφέρονται με διπλό τρόπο, προστατεύοντας αφενός μεν τα υγιή κύτταρα, ενώ παράλληλα καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα. Η δράση αυτή ενισχύεται και από τα πειράματα που δείχνουν τη συνάρτηση από τη συγκέντρωση.

## ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η σειρά των πειραμάτων έδωσε ενθαρυντικά αποτελέσματα σχετικά με τη δράση των πολυφαινολών εκχυλίσματος ροδιού σε καρκινικές σειρές καρκινικών κυττάρων μελανώματος. Το επόμενο βήμα θα πρέπει να είναι η εφαρμογή των πραπάνω αποτελεσμάτων πρέπει να μεταφερθούν σε πειραματόζωα, ώστε να υπάρχουν και *in vivo* αποτελέσματα. Επίσης πρέπει να γίνει πλήρης διαχωρισμός και παραλαβή των δραστικών ουσιών από το εκχύλισμα, ώστε να φανεί ο πραγματικός ρόλος των συστατικών του χυμού του ροδιού.

Προτείνεται επίσης να γίνουν πειράματα όπου το εκχύλισμα του ροδιού θα πρέπει να χορηγηθεί με αντικαρκινικά φάρμακα που χορηγούνται κατά τη χημειοθεραπεία, ώστε να διευκρινισθεί η ανασταλτική δράση πάνω στην p38α, για τη σωστή ανταπόκριση των θεραπευτικών σχημάτων. Και τούτο επειδή διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας SB202190 επηρεάζει τη δράση της οξαπλατίνης<sup>154</sup>.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the AJCC staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-48.
2. Balch CM, Soong SJ, Gershemwald JE et al. Prognostic factor analysis of 17600 melanoma patients: validation of the AJCC melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3622-34.
3. Christiansen JH, Coles EG, Wilkinson DG: Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:719.
4. Johnson TM, Dolan OM, Hamilton TA, et al. Clinical and histologic trends of melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:681-6.
5. Rigel DS: Melanoma up date: 2001. *Skin Cancer Found J* 19:13, 2001
6. Ahmedin J, Thomas A, Murray T. et al. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52:23, 2002.
7. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999;340:1341-8.
8. Naldi L, Lorenzo IG, Parazzini F, Gallus S, La Vecchia C. Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sun burns and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in the Italian population: results of a collaborative case control study. *Cancer* 2000;88:2703-10.
9. Green A, Siskind V, Bain C et al. Sunburn and malignant melanoma. *Br J Cancer* 1985; 51:393-7.
10. MacKie RM, Aitchison TC. Severe sunburn and subsequent risk of primary cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 1982; 46: 955-60.
11. Anaise D, Steinitz R, Ben Hur N. Solar radiation: a possible aetiological factor in malignant melanoma in Israel. A retrospective study 1960-72. *Cancer* 1978; 42: 299-304.
12. Walter SD, King WD, Marret LD. Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent sun exposure to ultraviolet radiation: results of a case control study in Ontario, Canada. *Int J Epidemiol* 1999; 28: 418-27.

13. Wang SQ, Setlow R, Berwick M et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 837-46.
14. Wesrerdahl J, Ingvar C, Masback A, Jonsson N, Olsson H. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UVA carcinogenicity. *Br J Cancer* 2000; 82: 1593-9.
15. Chen YT, Dubrow R, Zheng T et al. Sunlamp use and the risk of cutaneous melanoma: a population based case control study in Connecticut USA. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 758-65.
16. Smith MA, Fine JD, Barnhill RL, Berwick M. Hormonal and reproductive factors and risk of melanoma in women. *Int J Epidemiol* 1998; 27:751-7.
17. Pukkala E, Aspholm R, Auvinen A et al. Incidence of cancer among Nordic airline pilots over five decades: an occupational cohort study. *BMJ* 2002; 325:567-9.
18. Reed RJ. The histological variance of malignant melanoma: the interrelationship of histological subtype, neoplastic progression, and biological behavior. *Pathology* 1985; 17: 301-12.
19. Herlyn M, Houghton AN. Biology of melanocytes and melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Ser AJ, Soong S, editors. *Cutaneous melanoma*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992.
20. Jeffrey A. Sosman and Igor Puzanov. Molecular Targets in Melanoma from Angiogenesis to Apoptosis 1. *Clin Cancer Res*, 2006 12; 2376s
21. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):193-203.
22. Langley RGB et al. Clinical characteristics, in *Cutaneous Melanoma* , 3d ed, edited by CM Balch, AN Houghton, AJ Sober , SJ Soong. St Luis, Quality Medical Publishing, 1998 ; 81.
23. Wick MM, Sober AJ, Fitzpatrick TB, Mihm MC, Kopf AW, Clark WH, et al. Clinical characteristics of early cutaneous melanoma. *Cancer* 1980; 45:2684-6.
24. Milton GW. Clinical diagnosis of malignant melanoma. *Br J Surg* 1968;55:755-7.
25. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, et al. The ABCD rule of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 551-9.
26. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB et al. A new American Joint Committee on Cancer Staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000; 88: 1485-91.

27. Clark WHJ, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-27.
28. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-8.
29. Balda B.-R., Starz H. *European Handbook of Dermatological Treatments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (eds) AD Katsambas, L.M. Lotti. 2003, pp. 243-48.
30. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of Cancer *Cell* 2000, 100:57-70
31. Wattenberg L W 1985 Chemoprevention of cancer *Cancer Res.* 45 1-8
32. Caragay AB. Cancer-preventative foods and ingredients. *Food Tech* 1992;46(4):65-68.
33. Steinmetz, KA and JD Potter. Vegetables, fruit, and cancer, II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 1991;2:427-42
34. Harborne JB and Baxter H. *Phytochemical Dictionary*. London: Taylor and Francis. 1993
35. Σουλελές Χ. Γενική Φαρμακογνωσία Δρογοχημεία. Θεσσαλονίκη 1988. Εκδόσεις Τσολακοπούλου
36. Hirose M, Takahashi S, Ogawa K, Futakuchi M, Shirai T, Shibutani M, Uneyama C, Toyoda K, Iwata H. (1999) Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Letters*. 143(2):173-178
37. Franke AA, Cooney RV, Custer LJ, Mordan LJ, Tanaka Y. (1998) Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 439:237-248
38. Hodnick WF, Ahmad S, Pardini RS. (1998) Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 439:131-150
39. Lin YL, Cheng CY, et al. Effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase in rats. *J Agric Food Chem* 1998;46:1893-99.
40. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis*; 21(5):959-63 2000
41. Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolara P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *J Nutr.* 2002 Jun;132(6):1376-9



42. Bruneton J. (1995). *Pharmacognosy - Phytochemistry Medicinal plants* pp. 265-311, *Technique and Documentation - Lavoisier, Paris*.
43. Dey P.M. and Harborne J.B. (1989). *Methods in Plant Biochemistry Vol. I* pp.197-441, *Academic Press, London*.
44. Markham K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*, *Academic Press London, New York*.
45. Trease G.E., and Evans W.C. (1985). *Pharmacognosy*, ed. 12th, pp. 411-414, *Bailliere Tindal, London*.
46. Wijesekera R.O.B. (1991). *The Medicine Plant Industry*, pp. 115-118, *CRC Press, Boca Raton Ann. Arbor Boston London*.
47. Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, Galvano F, Bei R. effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci*. 2012 Jun 1;17:2396-418.
48. Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*. 1998;439:175-82. Review.
49. Majewska-Wierzbicka M, Czeczot H. Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases 2012 Jan;32(187):50-4. Review.
50. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011 Sep-Dec;48(5-6):197-216. Epub 2011 Dec 5. Review.
51. Vanden Berghe W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol Res*. 2012 Jun;65(6):565-76. Epub 2012 Mar 22. Review.
52. Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2012 Jul;31(3):206-38.
53. Chen KH, Weng MS, Lin JK. Tangeretin suppresses IL-1beta-induced cyclooxygenase (COX)-2 expression through inhibition of p38 MAPK, JNK, and AKT activation in human lung carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jan 15;73(2):215-27.
54. Bubols GB, Vianna DD, Medina-Remón A, von Poser G, Lamuela-Raventos RM, Eifler-Lima VL, Garcia SC. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Jul 30.
55. Cesar TB, Aptekmann NP, Araujo MP, Vinagre CC, Maranhão RC. Orange juice decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic subjects and improves lipid transfer to high-density lipoprotein in normal and hypercholesterolemic subjects. *Nutr Res*. 2010 Oct;30(10):689-94.
56. Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr*. 2000 Nov;72(5):1095-100.

57. Lucas and Syngé, Plant Red Data Book, 1978
58. Lanfey P. Why a pomegranate? *BMJ* 2000;321:1153-4
59. Longtin R. The pomegranate nature's power fruit? *J Natl Cancer Inst* 2003;95:346-8
60. New Larouse encyclopedia of mythology. London: Hamlyn, 1983
61. Gunter RT. The Greek herbal of Dioscorides. Oxford University Press, 1934:80-1
62. Chevallier A. Encyclopedia of medical plants. London: Dorling Kindersley, 1996:80-1
63. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.* 2008 Jun;13(2):128-44.
64. Dumlu MU, Gürkan E. Elemental and nutritional analysis of *Punica granatum* from Turkey. *J Med Food.* 2007 Jun;10(2):392-5.
65. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 2000 Oct;48(10):4581-9.
66. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem.* 2002 Jan 2;50(1):166-71.
67. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jan 19;109(2):177-206. Epub 2006 Sep 10.
68. Naqvi SA, Khan MS, Vohora SB. Antibacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 1991;62:221-228
69. Trombold JR, Barnes JN, Critchley L, Coyle EF. Ellagitannin consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 Mar;42(3):493-8.
70. González-Sarrías A, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Gómez-Sánchez MB, García-Talavera NV, Gil-Izquierdo A, Sánchez-Alvarez C, Fontana-Compiano LO, Morga-Egea JP, Pastor-Quirante FA, Martínez-Díaz F, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Occurrence of urolithins, gut microbiota ellagic acid metabolites and proliferation markers expression response in the human prostate gland upon consumption of walnuts and pomegranate juice. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Mar;54(3):311-22.
71. Jimenez Del Rio M, Ramazanov A, Sikorski S, Ramazanov Z, Chkhikvishvili I. A new method of standardization of health-promoting pomegranate fruit (*Punica granatum*) extract. *Georgian Med News.* 2006 Nov;(140):70-7.

72. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr.* 2004 Jun;23(3):423-33.
73. Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Feb;12(1):41-8.
74. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis.* 2001 Sep;158(1):195-8.
75. Gugliucci A. Beyond the antioxidant properties: pomegranate juice polyphenols increase hepatocyte paraoxonase 1 secretion. *Atherosclerosis.* 2010 Jan;208(1):28-9. Epub 2009 Oct 2.
76. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Cekmen M, Somay A, Tasci AI. Effects of pomegranate juice on hyperoxaluria-induced oxidative stress in the rat kidneys. *Ren Fail.* 2009;31(6):522-31.
77. Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK, Ferreira D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric Food Chem.* 2009 Sep 23;57(18):8344-9.
78. Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, Kim MS, Sohn DH, Kim HS, Park H, Shin DW, Rho JR, Kwon DY. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:690518. Epub 2011 Jan 12.
79. West T, Atzeva M, Holtzman DM. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev Neurosci.* 2007;29(4-5):363-72.
80. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. *Punica granatum* L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J Nutr.* 2005 Sep;135(9):2096-102.
81. Meenakshi Shukla, Kalpana Gupta, Zafar Rasheed, Khursheed A Khan and Tariq M Haqqi. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes in vitro. *J Inflamm (Lond).* 2008; 5: 9. Published online 2008 June 13.
82. Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, Seeram N, Liker H, Wang H, Elashoff R, Heber D, Aviram M, Ignarro L, Beldegrun A. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):4018-26.
83. Sartippour MR, Seeram NP, Rao JY, Moro A, Harris DM, Henning SM, Firouzi A, Rettig MB, Aronson WJ, Pantuck AJ, Heber D. Ellagitannin-rich pomegranate

- extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2008 Feb;32(2):475-80.
84. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14813-8. Epub 2005 Sep 28.
  85. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer.* 2005 Jan 20;113(3):423-33.
  86. Almudena Porras and Carmen Guerrero, Role of p38 $\alpha$  in apoptosis: implication in cancer development and therapy. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2010.
  87. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):807-69
  88. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jun;25(6):257-60
  89. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 1994 Aug 5;265(5173):808-11
  90. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):1039-49
  91. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):1027-37
  92. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38 $\alpha$  MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell.* 2000 Jul;6(1):109-16
  93. Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM. Essential role for p38 $\alpha$  mitogenactivated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10454-9
  94. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38 $\alpha$  in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell.* 2000 Jul 21;102(2):221-31
  95. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):537-49

96. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Zwiller J, Revel MO, Aunis D, Bader MF. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13113-20
97. De Zutter GS, Davis RJ. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 22;98(11):6168-73
98. Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol.* 2000 Jul 24;150(2):335-47
99. Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogenactivated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6272-9
100. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, Wang Y, Marber MS. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2237-46
101. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):2161-8
102. Zhang X, Shan P, Alam J, Davis RJ, Flavell RA, Lee PJ. Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):22061-70
103. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2007 Feb;11(2):191-205
104. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46
105. Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogenactivated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):147-52
106. Feng Y, Wen J, Chang CC. p38 Mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Nov;133(11):1850-6
107. Navas TA, Mohindru M, Estes M, Ma JY, Sokol L, Pahanish P, Parmar S, Haghazari E, Zhou L, Collins R, Kerr I, Nguyen AN, Xu Y, Plataniias LC, List AA, Higgins LS, Verma A. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood.* 2006 Dec 15;108(13):4170-7
108. Zhou L, Opalinska J, Verma A. p38 MAP kinase regulates stem cell apoptosis in human hematopoietic failure. *Cell Cycle.* 2007 Mar 1;6(5):534-7

109. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 1999 Dec 1;18(23):6845-54
110. Huang Y, Yuan ZM, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kato T, Kharbanda S, Kufe DW. Pro-apoptotic effect of the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to 1-beta-Darabinofuranosylcytosine. *Oncogene.* 1997 Oct 16;15(16):1947-52
111. Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2464-72
112. [No authors listed] Mechanisms of anti-cancer effects of plant polyphenols. II. Suppression on tumor growth. *Biomed Khim.* 2012 May-Jun;58(3):257-71.
113. Zinov'eva VN, Spasov AA. Mechanisms of plant polyphenols anti-cancer effects. I. Blockade of carcinogenesis initiation. *Biomed Khim.* 2012 Mar-Apr;58(2):160-75. Review. Russian.
114. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M, Rondanelli M. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev.* 2012 May 24.
115. Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1259:95-103. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06599.x. Review.
116. Santiago-Arteche R, Muñiz P, Cavia-Saiz M, Garcia-Giron C, García-Gonzalez M, Llorente-Ayala B, Corral MJ. Cancer chemotherapy reduces plasma total polyphenols and total antioxidants capacity in colorectal cancer patients. *Mol Biol Rep.* 2012 Oct;39(10):9355-60. Epub 2012 Jul 8
117. Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp.* 1995;61:103-16. Review.
118. Zheng R, Shi Y, Jia Z, Zhao C, Zhang Q, Tan X. Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev.* 2010 Aug;39(8):2827-34. Epub 2010 May 14. Review.
119. Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H. Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis.* 2007 Jan;28(1):163-73. Epub 2006 Aug 18.
120. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):17359-68. Epub 2006 Apr 17.

121. Syed DN, Afaq F, Sarfaraz S, Khan N, Kedlaya R, Setaluri V, Mukhtar H. Delphinidin inhibits cell proliferation and invasion via modulation of Met receptor phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Aug 15;231(1):52-60. Epub 2008 Apr 9.
122. Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14813-8. Epub 2005 Sep 28.
123. Leonetti C, Amodei S, D'Angelo C, Rizzo A, Benassi B, Antonelli A, Elli R, Stevens MF, D'Incalci M, Zupi G, Biroccio A. Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quinolo[4,3,2-k]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration. *Mol Pharmacol.* 2004 Nov;66(5):1138-46. Epub 2004 Aug 10.
124. Sah JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):12755-62. Epub 2003 Dec 29.
125. Ordan O, Rotem R, Jaspers I, Flescher E. Stress-responsive JNK mitogen-activated protein kinase mediates aspirin-induced suppression of B16 melanoma cellular proliferation. *Br J Pharmacol.* 2003 Mar;138(6):1156-62.
126. Alpert D, Schwenger P, Han J, Vilcek J. Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22176-83.
127. Schwenger P, Bellosta P, Vietor I, Basilico C, Skolnik EY, Vilcek J. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):2869-73.
128. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B alpha phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol.* 1998 Jan;18(1):78-84.
129. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates. *J Cell Physiol.* 1999 Apr;179(1):109-14.
130. Lee EJ, Park HG, Kang HS. Sodium salicylate induces apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells through activation of p38MAPK. *Int J Oncol.* 2003 Aug;23(2):503-8.
131. Frantz B, O'Neill EA. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF- $\kappa$ B. *Science.* 1995 Dec 22;270(5244):2017-9.
132. Xenos K., Margaroni G., Markantonis S., Tsimblouli Ch., Katsarou A., Katsambas A. Theophylline suppresses salicylic acid- activated p38 MAP

- kinase in sbcl1 melanoma cell cultures. Abstract number 951917, 15th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology.
133. Smalley KS, Eisen TG. Farnesyl thiosalicylic acid inhibits the growth of melanoma cells through a combination of cytostatic and pro-apoptotic effects. *Int J Cancer*. 2002 Apr 1;98(4):514-22.
  134. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett*. 2000 Jul 7;476(3):198-202.
  135. Gills JJ, Castillo SS, Zhang C, Petukhov PA, Memmott RM, Hollingshead M, Warfel N, Han J, Kozikowski AP, Dennis PA. Phosphatidylinositol ether lipid analogues that inhibit AKT also independently activate the stress kinase, p38alpha, through MKK3/6-independent and -dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27020-9. Epub 2007 Jul 13.
  136. Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011 Jan 12;366(1561):76-84.
  137. Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M, Makino N. Telomerase activity and telomere length distribution in vascular endothelial cells in a short-term culture under the presence of hydrogen peroxide. *Geriatr Gerontol Int*. 2012 Sep 18. doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00936.x.
  138. Afaq F, Katiyar SK. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Dec;11(14):1200-15. Review.
  139. Paller CJ, Ye X, Wozniak PJ, Gillespie BK, Sieber PR, Greengold RH, Stockton BR, Hertzman BL, Efros MD, Roper RP, Liker HR, Carducci MA. A randomized phase II study of pomegranate extract for men with rising PSA following initial therapy for localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2012 Jun 12. doi: 10.1038/pcan.2012.20.
  140. Adhami VM, Khan N, Mukhtar H. Cancer chemoprevention by pomegranate: laboratory and clinical evidence. *Nutr Cancer*. 2009;61(6):811-5. Review.
  141. Nair V, Dai Z, Khan M, Ciolino HP. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*. 2011 Sep;31(9):2699-704.
  142. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol*. 2008 Aug;46(8):2728-35. Epub 2008 May 4.
  143. Ι Αναστασοπούλου, Ακτινοχημεία. Χημεία ελευθέρων ριζών. Εφαρμογές στη Βιομηχανία, το Περιβάλλον τη βιολογία. Επανάδοση 2003.



144. Bong-Jeun An , Jae-Hoon Kwaka, Jun-Ho Son, Jung-Mi Park , Jin-Young Lee, Cheorun Jo, Myung-Woo Byun, Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols, *Food Chemistry* 88 (2004) 549–555
145. Y Sekiguchi , T Nakaniwa, T Kinoshita et al, Structural insight into human CK2a in complex with the potent inhibitor ellagic acid, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 2920–2923
146. Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3152-61. Review.
147. Ivanov VN, Ronai Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene*. 2000 Jun 15;19(26):3003-12.
148. X. Gong T. Luo , P. Deng, et al. Stress-induced interaction between p38 MAPK and HSP70, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (2012) 357–362
149. R.M. Angell, T.D. Angell, P. Bamborough, et al. Biphenyl amide p38 kinase inhibitors 2: Optimisation and SAR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (2008) 324–328
150. ter Haar E, Prabhakar P, Liu X, Lepre C. Crystal structure of the p38 alpha-MAPKAP kinase 2 heterodimer. *J Biol Chem*. 2007 Mar 30;282(13):9733-9. Epub 2007 Jan 25. Erratum in: *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):14684.
151. Ahn CH, Choi WC, Kong JY. Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. *Anticancer Res*. 1997 May-Jun;17(3C):1913-7.
152. Steinberg ML, Whittaker JR. Stimulation of melanotic expression in a melanoma cell line by theophylline. *J Cell Physiol*. 1976 Mar;87(3):265-75.
153. Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, Denis V, Vezzio-Vié N, Marzi L, Cortijo C, Ait-Arsa I, Askari N, Pourquier P, Martineau P, Del Rio M, Gongora C. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):1041-9. Epub 2010 Dec 15.
154. Junttila MR, Ala-Aho R, Jokilehto T, Peltonen J, Kallajoki M, Grenman R, Jaakkola P, Westermarck J, Kähäri VM. p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2007 Aug 9;26(36):5267-79. Epub 2007 Mar 5.
155. Gill K, Mohanti BK, Ashraf MS, Singh AK, Dey S. Quantification of p38αMAP kinase: a prognostic marker in HNSCC with respect to radiation therapy. *Clin Chim Acta*. 2012 Jan 18;413(1-2):219-25. Epub 2011 Oct 1.

156. Pillaire MJ, Nebreda AR, Darbon JM. Cisplatin and UV radiation induce activation of the stress-activated protein kinase p38gamma in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Nov 30;278(3):724-8.
157. Planchard D, Camara-Clayette V, Dorvault N, Soria JC, Fouret P. p38 mitogen-activated protein kinase signaling, ERCC1 expression, and viability of lung cancer cells from never or light smoker patients. *Cancer*. 2012 Oct 15;118(20):5015-25. doi: 10.1002/cncr.27510. Epub 2012 Mar 13.