



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής

ΜΑΚΡΗ ΡΑΦΑΕΛΑ

(Α.Μ. 20942)

Τίτλος πτυχιακής εργασίας

*«Φαρμακολογική αξιολόγηση ουσιών φυσικής προέλευσης στην
παθοφυσιολογία του καρκίνου του προστάτη»*



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΡΩΞΑΝΗ ΤΕΝΤΑ (επιβλέπουσα)

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

Αθήνα , 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Ρωξάνη Τέντα, πρώτα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ασχοληθώ με τον τομέα της έρευνας, καθώς και για την καθοδήγηση και τις εύστοχες παρατηρήσεις της στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον κύριο Τζώρτζη Νομικό και στην κυρία Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά τους στο βιοχημικό κομμάτι της πτυχιακής εργασίας και για την προθυμία τους να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου, για την ηθική συμπαράσταση και υποστήριξη που μου πρόσφεραν όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Πρώτο μέρος : Καρκίνος Προστάτη	5
Δεύτερο μέρος : Κρασί και προστατευτικές ιδιότητες	14
Τρίτο μέρος : Κολοκυθόσπορος και Προστατευτικές Ιδιότητες	22
Τέταρτο μέρος : Ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση	26
Πέμπτο μέρος : Αυτοφαγία	29
B. ΣΚΟΠΟΣ	34
Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	34
Απομόνωση και διαχωρισμός εκχυλισμάτων	34
Κυτταρική Σειρά Καρκίνου Προστάτη PC-3	34
Ανοσοφθορισμός - Αυτοφαγία.....	42
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
A) Προσδιορισμός νιτρωδών (NO_2)	44
B) Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)	46
Γ) Δραστικότητα ενζύμου υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης..	47
Δ) Αποτελέσματα μηχανισμού αυτοφαγίας	49
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

Περίληψη

Εισαγωγή : Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο στους άνδρες, μετά τον καρκίνο του δέρματος και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θνησιμότητας στους άνδρες. Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση μικροθρεπτικών συστατικών φυσικής προέλευσης, από φρούτα, λαχανικά και σπόρους, δρουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έναντι σε πληθώρα ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του προστάτη.

Σκοπός : Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η φαρμακολογική αξιολόγηση εκχυλίσμάτων ουσίων φυσικής προέλευσης ως προς την πιθανή χημειοπροστατευτική δράση τους σε κυτταρική σειρά καρκίνου προστάτη (PC-3).

Μεθοδολογία : Εκχυλίσματα κόκκινου κρασιού (ποικιλία Cabernet Sauvignon), λευκού (ποικιλία Ρομπόλα) και κολοκυθόσπορου παρελήφθησαν με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης και τα κλάσματα που προέκυψαν δοκιμάστηκαν στην ανδρογόνο-ανεξάρτητη ανθρώπινη προστατική καρκινική σειρά PC-3, που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη του καρκίνου του προστάτη. Στα κύτταρα PC-3 χορηγήθηκαν τα εκχυλίσματα αυτά και προσδιορίστηκε το οξειδωτικό στρες των κυττάρων αυτών μέσω υπολογισμού των νιτρωδών (NO_2) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Επίσης μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τέλος, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αυτοφαγικής δραστηριότητας των καρκινικών κυττάρων PC-3 με και χωρίς την επίδραση των εκχυλίσμάτων.

Αποτελέσματα: Τα κύτταρα που επωάστηκαν με εκχύλισμα κόκκινου κρασιού (FIIC) παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση νιτρωδών και υπεροξειδίου του υδρογόνου ($p < 0.00$). Υψηλή συγκέντρωση νιτρωδών παρατηρήθηκε με το εκχύλισμα κολοκυθόσπορου (KPL), ενώ αντίθετα με την επίδραση του λευκού κρασιού (FIIA) παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στην περιεκτικότητα νιτρωδών. Όσον αφορά στον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του σχεδόν σε όλα τα εκχυλίσματα. Επιπλέον, η δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX-1) αυξάνει μετά τη χορήγηση κολοκυθόσπορου (KPL, KW) στα κύτταρα PC-3. Τέλος, τόσο η ρεσβερατρόλη όσο και τα εκχυλίσματα λευκού και κόκκινου κρασιού αλλά και κολοκυθόσπορου που δοκιμάστηκαν, προκαλούν επαγωγή της αυτοφαγίας στα κύτταρα PC-3.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα του κρασιού και του κολοκυθόσπορου, που μελετήθηκαν έχουν επίδραση στα επίπεδα οξειδωτικού στρες και στο μηχανισμό της αυτοφαγίας των προστατικών καρκινικών κυττάρων PC-3 και ενδέχεται να συνεισφέρουν στην πρόληψη και στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη, εφόσον γίνουν περαιτέρω εμπεριστατωμένες μελέτες.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρώτο μέρος : Καρκίνος Προστάτη

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στον κόσμο, μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Εμφανίζεται όταν φυσιολογικά κύτταρα σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος αρχίζουν να αναπτύσσονται εκτός ελέγχου.

Η αύξηση του μέσου όρου ζωής έχει σαν αποτέλεσμα και την αύξηση των παθήσεων του προστάτη, με τον καρκίνο του προστάτη να φαίνεται ότι θα πάρει επιδημικές διαστάσεις τα επόμενα 20 χρόνια.^[1]

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η λέξη «καρκίνος» προήλθε από τον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη (460-370 π.Χ.) που θεωρείται και ο πατέρας της Ιατρικής, ωστόσο δεν ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε την ασθένεια αυτή. Για να περιγράψει τον καρκίνο χρησιμοποίησε τις ελληνικές λέξεις καρκίνος και καρκίνωμα και αναφερόταν σε χρόνια έλκη και κακοήγη όγκους.^[2]

Η παλαιότερη περιγραφή του καρκίνου, αν και η λέξη καρκίνος δεν είχε χρησιμοποιηθεί, πραγματοποιήθηκε στην Αίγυπτο. Χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ. και περιγράφει 8 περιπτώσεις ελκών ή όγκων του μαστού. Εκεί αναφέρεται ότι δεν υπάρχει θεραπεία για τον καρκίνο παρά μόνο παρηγορητική.^[3] Μερικά από τα πρώτα στοιχεία του ανθρώπινου καρκίνου των οστών, βρέθηκαν σε μούμιες και σε παλιά χειρόγραφα στην αρχαία Αίγυπτο γύρω στο 1600 π.Χ. Σύμφωνα με τις επιγραφές, οι επιφανειακοί όγκοι είχαν αφαιρεθεί χειρουργικά με παρόμοιο τρόπο όπως απομακρύνονται σήμερα.^[2]

ΘΕΩΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Χυμική θεωρία : Ο Ιπποκράτης πίστευε ότι το σώμα έχει 4 χυμούς (υγρά) : αίμα, φλέγμα, κίτρινη και μαύρη χολή. Οποιαδήποτε ανισορροπία αυτών των χυμών οδηγεί στην εμφάνιση ασθένειας, ενώ όταν βρίσκονται σε ισορροπία το άτομο είναι υγιές.^[3] Η υπερβολική ποσότητα μαύρης χολής σε συγκεκριμένα μέρη του σώματος είναι ικανή να προκαλέσει καρκίνο.^[2] Αυτή η θεωρία για τον καρκίνο ήταν πρότυπο από το Μεσαίωνα έως και 1300 χρόνια μετά, μέχρι και τη Ρωμαϊκή εποχή και όπου και τη διέδωσε ο διάσημος γιατρός Γαληνός. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου η μελέτη του ανθρώπινου σώματος, όπως και της αυτοψίας, είχε απαγορευτεί για θρησκευτικούς λόγους.^[3]

Τον 17^ο αιώνα αναπτύχθηκε η λεμφική θεωρία που θεωρούσε ότι ο σχηματισμός καρκίνου προέρχεται από ένα υγρό που ονομάζεται λέμφος.^[2] Το 1838 ο Γερμανός παθολόγος Johannes Muller έδειξε ότι ο καρκίνος αποτελείται από κύτταρα και όχι λεμφαδένες, αλλά πίστευε ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν προέρχονται από τα

φυσιολογικά κύτταρα (βλαστική θεωρία). Ο μαθητής του, Rudolph Virchow (1821-1902), διάσημος γερμανικός παθολόγος, καθορίζει ότι όλα τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, προέρχονται από άλλα κύτταρα. Ο Virchow πίστευε ότι η αιτία του κακού ήταν ο χρόνιος ερεθισμός, ενώ ο Thiersch απέδειξε ότι οι κακοήθεις όγκοι αναπαράγονται με μεταστάσεις μέσω της εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων και όχι μέσω κάποιου άγνωστου υγρού.^[3] Από τα τέλη του 1800 μέχρι τη δεκαετία του 1920, ο καρκίνος πίστευαν ότι προκαλείται από τραύμα. Τον 17ο με 18ο αιώνα, μια θεωρία αναφέρει ότι ο καρκίνος είναι μεταδοτική νόσος και μεταδίδεται μέσω παρασίτων.^[2]

Από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα οι επιστήμονες είχαν τα απαραίτητα εργαλεία για την επίλυση των σύνθετων προβλημάτων της χημείας και της βιολογίας πίσω από τον καρκίνο. Οι James Watson και Francis Crick έλαβαν το βραβείο Νόμπελ το 1962 για την ανακάλυψη της δομής του DNA, του βασικού υλικού των γονιδίων. Οι επιστήμονες διατύπωσαν ότι μία από τις συχνότερες αιτίες που προκαλούν καρκίνο είναι η γενετική βλάβη που οδηγεί σε μη φυσιολογικές ομάδες κυττάρων, αλλά και οι καρκινογόνες χημικές ουσίες, η ακτινοβολία και οι ιοί.^[2] Τα φυσιολογικά κύτταρα με τη βλάβη στο DNA πεθαίνουν ενώ τα καρκινικά επιβιώνουν.^[3]

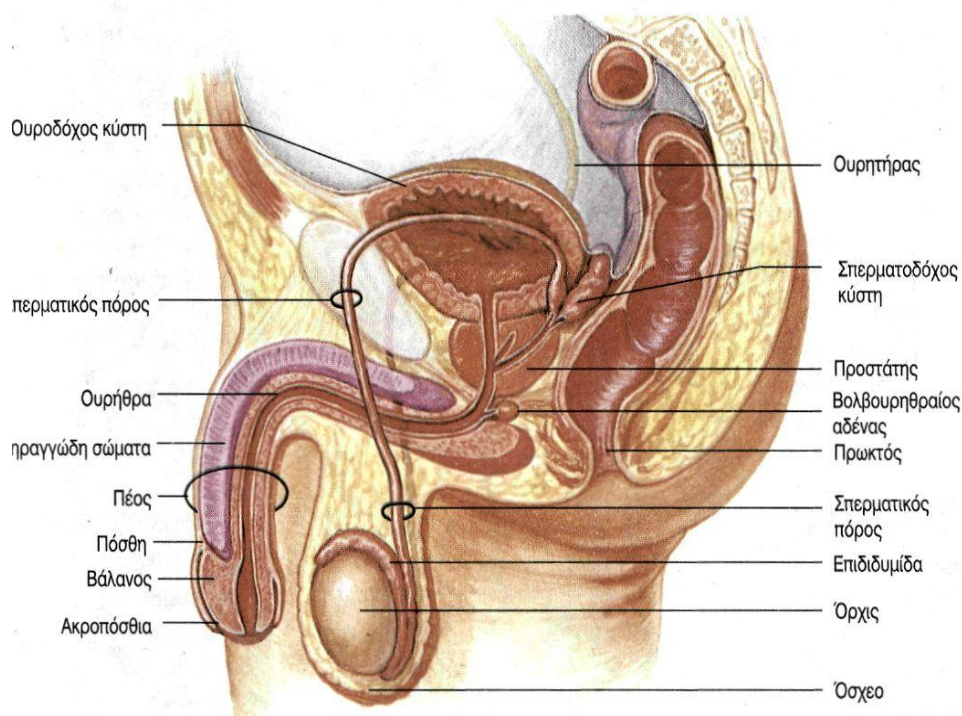
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Ο όρος προστάτης προέρχεται από την ελληνική λέξη «prohistani» που σημαίνει «στέκεται μπροστά του» και έχει αποδοθεί στον Ηρόφιλο της Αλεξάνδρειας που χρησιμοποίησε τον όρο αυτό το 355 π.Χ. για να περιγράψει το όργανο αυτό που βρίσκεται μπροστά από την ουροδόχο κύστη. Παρόλο που η παρουσία του προστάτη είχε αναγνωριστεί εδώ και 2300 χρόνια, η ακριβής περιγραφή της εσωτερικής δομής του αδένος, καθώς και της φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του είναι πολύ πρόσφατη.^[4] Σύμφωνα με την πρωτοποριακή μελέτη του McNeal ο προστάτης αδένος είναι ένα σύνθετο όργανο το οποίο αποτελείται από τέσσερις μορφολογικά διαφορετικές ζώνες :

- Η κεντρική ζώνη, η οποία καταλαμβάνει το 25% ενός υγιούς προστάτη. Η περιοχή αυτή περιβάλλει την ουρήθρα που αποτελεί τον εκτοξευτικό σωλήνα του σπέρματος, ενώ μόνο το 5% των καρκίνων εμφανίζονται στην κεντρική ζώνη.
- Η περιφερική ζώνη, η οποία καταλαμβάνει το 65% ενός υγιούς αδένος του προστάτη, ενώ στη ζώνη αυτή εμφανίζεται η πλειοψηφία του καρκίνου του προστάτη (ποσοστό γύρω στο 70%).
- Η μεταβατική ζώνη, περικλείει τη προστατική ουρήθρα και καταλαμβάνει το 5-10% του όγκου ενός υγιούς προστάτη. Το 25% των καρκίνων προστάτη εμφανίζεται στην περιοχή αυτή, όμως στη ζώνη αυτή εμφανίζονται κυρίως καλοήθεις προστατικές υπερπλασίες (BPH)
- Η πρόσθια ζώνη, η οποία είναι ένα ινομυώδες στρώμα.^[4-5]

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Ο προστάτης είναι ένα εξωκρινής αδένας που βρίσκεται στο εσωτερικό του σώματος κάθε άνδρα, κάτω από την ουροδόχο κύστη και περιβάλλει την ουρήθρα.



Εικόνα : Τοπολογία προστάτη στο ανθρώπινο σώμα

(Ηλεκτρονικό βιβλίο, Βιολογία Α Γενικού Λυκείου
Κεφάλαιο 12 Αναπαραγωγή - Ανάπτυξη)

Ο προστάτης αδένας έχει μέγεθος και σχήμα κασάνου και βάρους 18-25g. Αποτελείται από ινομυώδη και αδενικό ιστό. Ο ινομυώδης περιβάλλει τον προστάτη αδένα εξωτερικά, ενώ οι αδένες του προστάτη αποτελούνται από πόρους οι οποίοι και καταλήγουν στους αύλακες της προστατικής ουρήθρας. Ο αδένας υπάρχει στον άνδρα ήδη από τη στιγμή της γέννησής του και αυξάνει σε μέγεθος ακολουθώντας ένα αργό ρυθμό από την γέννηση έως την εφηβεία, και μετά επεκτείνεται με ταχύ ρυθμό. Το μέγεθος του παραμένει σταθερό μεταξύ 30-45 ετών, ενώ μετά περαιτέρω διεύρυνση μπορεί να επιτευχθεί.^[6]

Ο προστάτης αδένας εκκρίνει ένα λεπτόρρευστο, γαλακτώδες υγρό που αποτελεί το 20% περίπου του όγκου του σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση, όπου εξέρχεται μέσα στην προστατική ουρήθρα και αναμειγνύεται με αυτό. Το έκκριμα αυτό περιέχει ψευδάργυρο, φωσφολιπίδια, ασβέστιο, κιτρικό οξύ που χρησιμοποιείται από το σπέρμα για την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του Krebs. Περιέχει φωσφατάσες και πρωτεολυτικά ένζυμα όπως το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), πεψινογόνο, λυσοζύμη, αμυλάση που προκαλούν ρευστοποίηση του σπέρματος μετά την εκσπερμάτωση. Η μείωση και έλλειψη των ενζύμων αυτών που συμβαίνει κυρίως στις

φλεγμονές του προστάτη, συνεπάγεται καθυστέρηση στη ρευστοποίηση και δυσμενή επίδραση στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Το υγρό αυτό αποτελεί πολύ σημαντικό συστατικό γιατί έχει pH=6,5 και εξουδετερώνει την οξύτητα των υπόλοιπων υγρών, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η κινητικότητα και η γονιμότητα των σπερματοζωαρίων.^[6-7] Η φυσιολογική λειτουργία και ανάπτυξη του προστάτη καθορίζεται από την παρουσία τεστοστερόνης ορού, καθώς φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη και μερικοί αυξητικοί παράγοντες πρωτεϊνικού τύπου όπως η ουρογαστρόνη. Πάνω από το 95% της τεστοστερόνης μετατρέπεται στο πιο σημαντικό προστατικό ανδρογόνο, την διϋδροτεστοστερόνη (DHT).^[8]

ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΣΤΑΤΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (PSA)

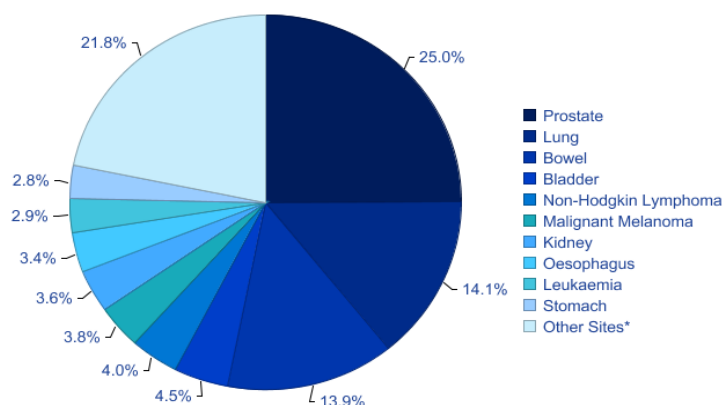
Η PSA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία παράγεται από τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα. Εκκρίνεται στο σπερματικό υγρό όπου διασπά τις πρωτεΐνες σεμενογελίνη I και II με αποτέλεσμα να υγροποιείται το σπέρμα και έτσι τα σπερματοζωάρια να κινούνται πιο ελεύθερα.^[9] Το ειδικό προστατικό ανδρογόνο παράγεται και σε φυσιολογικά αλλά και στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Λόγω μιας αλλαγής στην αρχιτεκτονική του προστάτη σε συνθήκες όπως η προστατίτιδα, η καλοήθης προστατική υπερπλασία (BPH) καθώς και στον καρκίνο του προστάτη τα επίπεδα του PSA είναι αυξημένα στην κυκλοφορία του αίματος. Η εξέταση PSA είναι αυτή τη στιγμή η καλύτερη μέθοδος για τον εντοπισμό του αυξημένου κινδύνου για καρκίνο του προστάτη. Ωστόσο λόγω δεδομένου ότι το PSA είναι ένζυμο το οποίο βρίσκεται και στα φυσιολογικά κύτταρα του προστάτη καθώς αυξάνεται και σε άλλες περιπτώσεις εκτός νεοπλασίας, χρειάζεται προσοχή στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.^[10]

Η πρώτη δημοσίευση που περιγράφει το PSA εμφανίστηκε το 1960. Η εξέταση έγινε αρκετά δημοφιλής και χρησιμοποιήθηκε ευρέως από τα τέλη της δεκαετίας του 1980. Το 1986, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων ενέκρινε το PSA ως μια δοκιμή για να βοηθήσει τη διαχείριση των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο προστάτη. Το 1994, η εξέταση του PSA εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων ως ένα διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη.^[11]

Στην Αμερική διαπιστώθηκε ότι προ-PSA εξέτασης ο κίνδυνος να διαγνωστεί ένας άνδρας στη ζωή του με καρκίνο του προστάτη ήταν 8%, ενώ με την έναρξη εξέτασης για το PSA ο κίνδυνος διάγνωσης καρκίνου του προστάτη ανήλθε στο 19%.^[12] Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει σημαντική μείωση στα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο του προστάτη, που συνάδει με την εισαγωγή του προσυμπτωματικού ελέγχου PSA.^[13]

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο τους άνδρες. Το 2008, είχαν καταγραφεί 899.000 νέες περιπτώσεις με καρκίνο του προστάτη παγκοσμίως, που αποτελούσαν το 13,6% των διαγνωσμένων καρκίνων. Σχεδόν τα τρία τέταρτα (75%) των καταγεγραμμένων περιπτώσεων συμβαίνουν στις αναπτυγμένες χώρες (644 000 περιπτώσεις). Με περίπου 258.000 θανάτους το 2008, ο καρκίνος του προστάτη είναι η έκτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες (6,1% του συνόλου).^[14] Όσον αφορά την Ευρώπη, ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος στους άνδρες, με 345,900 περιπτώσεις, δηλαδή ποσοστό 20,3% και αποτελεί την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο (9,2% των περιπτώσεων). Στο Ηνωμένο Βασίλειο ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη το 2010 ήταν 40.975 που αποτελούσε το 25% του συνόλου των καρκίνων, εκτός του καρκίνου του δέρματος.



Η μεταβολή του ποσοστού της εμφάνισης καρκίνου του προστάτη την τελευταία δεκαετία στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι αξιοσημείωτη. Από τα 86 περιστατικά ανά 100,000 στην περίοδο 1999-2001, αυξήθηκαν στα 106,4 περιστατικά / 100,000 την περίοδο 2008-2010. Δηλαδή, παρατηρήθηκε αύξηση κατά 22% του δείκτη επίπτωσης του καρκίνου του προστάτη.^[15]

Στις Ηνωμένες Πολιτείες ο καρκίνος του προστάτη είναι η πιο συνηθισμένη μορφή καρκίνου στους άνδρες μετά τον καρκίνο του δέρματος. Εκτιμάται ότι το 2013 το 28% των νέων περιπτώσεων καρκίνου στις ΗΠΑ θα είναι από καρκίνο του προστάτη και για ένα ποσοστό γύρω στο 10% θα είναι και η αιτία θανάτου. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες ο καρκίνος του προστάτη είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες, μετά από τον καρκίνο στους πνεύμονες. Από το 2005 έως το 2009 η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη στις ΗΠΑ υπολογίσθηκε 151,4 ανά 100.000 με συνολικές περιπτώσεις καρκίνων 550,7 και οι περιπτώσεις θανάτων από καρκίνο προστάτη υπολογίσθηκαν 23,6 ανά 100,000 σε σύνολο 219,4 θανάτων από όλα τα είδη

καρκίνου.^[16] Το 2011 διαγνώστηκαν 240890 άνδρες με καρκίνο του προστάτη στις ΗΠΑ και 33720 πέθαναν από αυτόν.^[17] Στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι 1 στους 6 άνδρες (16,2%) θα εμφανίσει καρκίνο του προστάτη κάποια στιγμή στη διάρκεια της ζωής του και 1 στους 33 θα πεθάνει από αυτόν.^[16]

Ο καρκίνος του προστάτη είναι μια ασθένεια που προσβάλλει κατά κύριο λόγο τους ηλικιωμένους άνδρες, και παρά τη διαδεδομένη χρήση των δοκιμών PSA σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του προστάτη έχει αυξηθεί κατά περίπου 16% από το 1995 γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ταχεία αύξηση του αριθμού των ανδρών που φθάνουν σε μεγαλύτερες ηλικίες.^[18-19]

Η εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη εμφανίζει μια ευρεία παγκόσμια διακύμανση. Χώρες υψηλού κινδύνου είναι οι ΗΠΑ, ενώ χαμηλότερη επίπτωση φαίνεται να έχουν στην Ασία (Κίνα, Ιαπωνία). Σύμφωνα με την παγκόσμια μελέτη GLOBOCAN 2008, τα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη ποικίλλουν κατά περισσότερο από 25-πλάσια σε παγκόσμιο επίπεδο.^[14] Τα υψηλότερα ποσοστά είναι σε Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία (104,2 ανά 100.000), ακολουθεί η Βόρεια Αμερική και η Δυτική και Βόρεια Ευρώπη. Σχετικά υψηλά ποσοστά καταγράφηκαν σε ορισμένες αναπτυσσόμενες περιοχές όπως η Καραϊβική, Νότια Αμερική και η υποσαχάρια Αφρική. Χαμηλότερη επίπτωση εκτιμάται στη Νότια-Κεντρική Ασία (4,1 ανά 100.000). Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι γενικά υψηλά σε μαύρους κυρίως πληθυσμούς (Καραϊβική, 26,3 ανά 100.000 και υπο-Σαχάρια Αφρική, 18-19 ανά 100.000), πολύ χαμηλή στην Ασία (2,5 ανά 100.000) και ενδιάμεσα ποσοστά σε Ευρώπη και Ωκεανία.^[14]

Σημαντική απόκλιση στους δείκτες επίπτωσης και θνησιμότητας φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των διάφορων φυλών των ΗΠΑ. Οι Αφροαμερικάνοι έχουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του προστάτη αλλά και αριθμό θανάτων από τη νόσο αυτή.^[20-23] Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη στην Αφρική είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την περίπτωση των Αφροαμερικάνων. Παρ'όλα αυτά σε πολλές Αφρικανικές χώρες, όπως η Νιγηρία, η επίπτωση της νόσου φαίνεται να έχει αυξηθεί με την πάροδο του χρόνου. Αυτό ισχύει και για άλλες χώρες όπως η Κορέα.^[23-26] Αυτή η αύξηση στα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκίνου του προστάτη πιθανόν να εξηγείται εν μέρει από την τάση προς τη δυτικοποίηση (westernization). Η δυτικοποίηση περιλαμβάνει την αυξημένη πρόσληψη ζωικής προέλευσης τροφίμων και την αύξηση του επιπολασμού κοιλιακής και συνολικής παχυσαρκίας σε αυτές τις χώρες.^[23, 26-28]

Η μεγαλύτερη εμφάνιση περιστατικών με καρκίνο του προστάτη, εξηγείται, σε μικρότερο βαθμό και από την βελτίωση της ανίχνευσης της ασθένειας με το διαγνωστικό εργαλείο PSA.^[23, 26-27] Ο καρκίνος του προστάτη αναφέρεται και ως νόσος των ηλικιωμένων, καθώς έχει μεγαλύτερη επίπτωση σε μεγαλύτερους ηλικιακά άνδρες. Η εμφάνιση του καρκίνου στον προστάτη αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας, με την πλειοψηφία των ατόμων να εμφανίζουν καρκίνο του προστάτη μετά τα

65 έτη. Οι περιπτώσεις καρκίνου προστάτη σε άτομα κάτω των 50 ετών καταλαμβάνουν μόλις το 1%.^[14-15, 20] Ωστόσο ακόμη και σε αυτή την ηλικιακή ομάδα (40-49 ετών) αλλά και στις ηλικίες 0-39 ετών, έχει παρατηρηθεί μια σχετική αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του προστάτη τα τελευταία χρόνια. Παράλληλα, η επίπτωση της νόσου φαίνεται μειωμένη σε άνδρες άνω των 70, ενώ η επίπτωση της νόσου ανεξαρτήτου ηλικίας παραμένει σταθερή.^[29]

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι πολυπαραγοντική νόσος. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη είναι η ηλικία, η φυλή και το οικογενειακό ιστορικό.^[23, 30]

Η ηλικία αποτελεί ίσως το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου. Όσο αυξάνει η ηλικία τόσο μεγαλύτερος είναι και ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.^[31] Μικρότερο ποσοστό από το 0,6% των περιπτώσεων που έχουν διαγνωσθεί εμφάνισε καρκίνο πριν την ηλικία των 45, ενώ η πλειοψηφία των ατόμων (62-75%) εμφανίζει καρκίνο μετά τα 65 έτη.^[32] Τα 2/3 των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη είναι άνδρες άνω των 50 ετών. Στατιστικά δεδομένα στις ΗΠΑ δείχνουν αναλυτικά την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη ανά εύρος ηλικιών. Στις ηλικίες 0-39 η πιθανότητα είναι μόλις 0,01%, στα 40-59 έτη φτάνει στο 2,68%, από 60-69 έτη 6,78% (1 στους 15) και πάνω από την ηλικία των 70 η πιθανότητα ανέρχεται στο 12,06%, που σημαίνει 1 στους 8 άνδρες θα εμφανίσουν καρκίνο του προστάτη.^[16]

Η χώρα, η εθνικότητα και οι φυλετικές ομάδες φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη αφού οι δείκτες επίπτωσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ εθνικοτήτων. Περιοχές υψηλότερου κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη είναι η Βόρεια Αμερική, τα νησιά της Καραϊβικής, η Τζαμάικα, η Αυστραλία και η Βορειοδυτική Ευρώπη, ενώ χαμηλού κινδύνου είναι οι περισσότερες περιοχές της Αφρικής, της Ασίας και Κεντρικής Αμερικής. Εκτός από τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των χωρών, μεγάλη απόκλιση στο δείκτη επίπτωσης υπάρχει μεταξύ των μαύρων πληθυσμών και λευκών. Συγκεκριμένα, οι Αφροαμερικανοί έχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του προστάτη, αλλά και να πεθάνουν από αυτόν. Παρόλα αυτά οι ισπανόφωνοι Αμερικάνοι και γενικά οι ανοικτόχρωμοι εμφανίζουν πολύ χαμηλότερη επίπτωση.^[20] Οι λόγοι για την υψηλότερη συχνότητα στους Αφροαμερικανούς είναι άγνωστοι αλλά πιθανόν είναι πολυπαραγοντικοί, συνδυάζοντας περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Φαίνεται να παίζει και κάποιο ρόλο η διϋδροτεστοστερόνη (DHT) αφού έχουν διαπιστωθεί αυξημένα επίπεδα στους Αφροαμερικάνους και αντίστοιχα μειωμένα επίπεδα στους Ασιάτες που έχουν πολύ χαμηλότερη επίπτωση καρκίνου του προστάτη.^[33] Χαρακτηριστικό παράδειγμα για την επίδραση που έχει το περιβάλλον είναι ότι ενώ οι ντόπιοι Ιάπωνες παρουσίασαν πολύ χαμηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη, ο κίνδυνος είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε Ιάπωνες μετανάστες στην Αμερική. Παρατηρήθηκε και

προοδευτική αύξηση του κινδύνου στις επόμενες γενιές και στο τέλος ο κίνδυνος γίνεται ίσος με τον αντίστοιχο του πληθυσμού της Αμερικής.^[34]

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό έχει φανεί ότι αποτελεί ένα από τους παράγοντες κινδύνου που μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη.^[35-36] Σε πληθυσμό ασθενών της Βόρειας Αμερικής βρέθηκε ότι το 54% των ασθενών από καρκίνο του προστάτη είχαν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη.^[36-37] Έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου σε άτομα με προσβεβλημένο αδερφό σε σύγκριση με αυτά που είχε τη νόσο ο πατέρας τους.^[38] Σε μελέτη με δίδυμα αδέρφια αποδεικνύεται η αυξημένη επίδραση του οικογενειακού ιστορικού και των γενετικών παραγόντων αφού φαίνεται ότι ο δίδυμος αδερφός του πάσχοντος έχει αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσει και αυτός καρκίνο του προστάτη.^[39] Το 2002, ο Bratt ανέφερε ότι ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη κυμαίνεται από 12-15% σε σχέση με 8% όταν υπάρχει αρνητικό οικογενειακό ιστορικό για τον καρκίνο του προστάτη. Ο σχετικός κίνδυνος αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των πάσχοντων μέλων της οικογένειας.^[40] Ο κίνδυνος επομένως, αυξάνει όσο αυξάνει και ο αριθμός των ασθενών στην οικογένεια. Τα κλινικά κριτήρια για αυξημένο κίνδυνο είναι όταν : α) τρεις ή περισσότεροι άνδρες με πρώτου βαθμού συγγένεια έχουν προσβληθεί, β) δύο πρώτου βαθμού συγγένειας έχουν διαγνωσθεί πριν την ηλικία των 55, γ) τουλάχιστον τρεις περιπτώσεις πρώτου και δεύτερου βαθμού συγγένειας έχουν μεταστατικό καρκίνο.^[32]

Άλλοι παράγοντες που έχουν μελετηθεί και ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη ως προστατευτικοί ή επιβαρυντικοί παράγοντες είναι η διατροφή και κάποιες αντιοξειδωτικές ουσίες, η βιταμίνη D, η παχυσαρκία, η αλλαγή σωματικού βάρους, τα επίπεδα ορμονών, το κάπνισμα και η σωματική δραστηριότητα. Όσον αφορά στην παχυσαρκία ως παράγοντα κινδύνου, πολλές μελέτες δείχνουν ότι αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση επιθετικής μορφής καρκίνου του προστάτη και τον κίνδυνο θνησιμότητας^[41] και ότι μειώνει τον κίνδυνο για ελαφράς μορφής καρκίνου του προστάτη.^[42-43] Η σχέση μεταξύ δείκτη μάζας σώματος και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη είναι πολύπλοκη λόγω του ότι η παχυσαρκία συνδέεται με πολλούς ορμονικούς παράγοντες που πιθανόν να έχουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της νόσου.^[44] Τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης, χαμηλά επίπεδα αντιπυρεκτίνης και τεστοστερόνης και τα υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών που επικρατούν στην παχυσαρκία μπορούν να αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη.^[30] Επιπλέον, η επίδραση της παχυσαρκίας και του αυξημένου ΔΜΣ στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό.^[44] Η αλλαγή του σωματικού βάρους από την ηλικία των 18 ετών στην ενηλικίωση δεν συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη, όπως δείχνουν οι περισσότερες έρευνες έως τώρα. Η μεγάλη αύξηση βάρους στο διάστημα αυτό, έχει συσχετισθεί με αυξημένη θνησιμότητα από τη νόσο.^[41]

Η σωματική άσκηση και η αύξηση του επιπέδου της φυσικής δραστηριότητας, με βάση την πλειονότητα των μελετών που έχουν γίνει, ενδέχεται να προκαλεί μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.^[45] Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος καρκινογένεσης μειώνεται κατά 10-30% στα πιο δραστήρια άτομα σε σύγκριση με τα λιγότερο δραστήρια.^[46] Η έντονη άσκηση, μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη.^[47] Το συστηματικό κάπνισμα, σύμφωνα με τελευταία αναθεώρηση στοιχείων, είναι πιθανό να συμβάλει σε υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο του προστάτη.^[44]

Όσον αφορά στις διατροφικές συνήθειες, αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια σημαντική αντίστροφη σχέση μεταξύ της υψηλής κατανάλωσης τομάτας και των προϊόντων τομάτας και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Σε μερικές μελέτες η συστηματική κατανάλωση τομάτας φάνηκε ότι οδηγεί σε 15-50% χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη αλλά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες μελέτες. Η σχέση αυτή έχει αποδοθεί σε ένα συστατικό της τομάτας, το λυκοπένιο. Ανήκει στην ομάδα των καροτενοειδών, έχει ισχυρή αντι-οξειδωτική δράση^[48] και πιθανόν να εμπλέκεται στην καταστολή της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη.^[44, 49-50]

Η βιταμίνη Ε, είναι μια ευρέως διαδεδομένη αντιοξειδωτική ουσία που προστατεύει τα κύτταρα από την καταστροφή και που πιθανόν να έχει και αντικαρκινική δράση λόγω της ιδιότητάς της να επιδιορθώνει τυχόν βλάβες του DNA και να αναστέλλει την καρκινογένεση. Σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια έχει διαπιστωθεί η αντικαρκινική δράση των τοκοφερολών (βιταμίνη Ε),^[51] αλλά και η αναστολή της ανάπτυξης των ήδη εγκατεστημένων όγκων στα προστατικά κύτταρα LnCaP.^[52] Εντούτοις, τα αποτελέσματα μιας μεγάλης έρευνας (SELECT study) δεν επιβεβαίωσαν τη δράση αυτή. Αντίθετα η δόση βιταμίνης Ε που χορηγήθηκε από συμπληρώματα, όχι μόνο δε μείωσε τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη, αλλά αντίθετα ο κίνδυνος για ανάπτυξη καρκίνου βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος.^[53-54] Στη δοκιμή SELECT διερευνήθηκε και η επίδραση που έχει το ιχνοστοιχείο σελήνιο στην επίπτωση του καρκίνου του προστάτη αλλά δεν βρέθηκε συσχέτιση μετά από χορήγηση συμπληρωμάτων σεληνίου. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το σελήνιο μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, αλλά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.^[55] Το σελήνιο δεν είναι αντιοξειδωτικό αλλά είναι βασικό συστατικό του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καθώς και άλλων σεληνοπρωτεϊνών που έχουν αναφερθεί ως αναστολείς της καρκινογένεσης.

Τα τελευταία χρόνια διερευνάται κατά πόσο τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα επίπεδα ασβεστίου και η βιταμίνη D έχουν κάποια συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Μερικές έρευνες έδειξαν αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης με την αυξημένη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, πιθανόν λόγω του περιεχόμενου ασβεστίου που με τη σειρά του μεταβάλλει και τα επίπεδα της 1,25 υδροξυ-βιταμίνης D στον οργανισμό.^[56-57] Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι οι περιεχόμενες φωσφορικές ενώσεις που πιθανόν να ευθύνονται για των αυξημένο κίνδυνο που παρατηρήθηκε με την κατανάλωση των γαλακτοκομικών προϊόντων, όμως χρειάζεται περαιτέρω έρευνα σε αυτό το θέμα.^[58] Όσον αφορά στη βιταμίνη D, μερικές μελέτες δεν κατέδειξαν κάποια συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη^[59-60] ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι χαμηλά επίπεδα 1,25-υδροξυ-βιταμίνης D

συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του προστάτη.^[56, 61] Τέλος, έχει αναφερθεί ότι υψηλή κατανάλωση διαιτητικών λιπαρών και ιδιαίτερα του α-λινολεϊκού οξέως πιθανόν να αυξάνει τον κίνδυνο του καρκίνου του προστάτη κατά δύο με τρεις φορές.^[54]

Δεύτερο μέρος : Κρασί και προστατευτικές ιδιότητες

Η γνώση για τα σταφύλια και το κρασί είναι τόσο παλιά όσο και η πολιτιστική ιστορία της ανθρωπότητας. Είναι γνωστό από την αρχαιότητα ότι η κατανάλωση του κρασιού μπορεί να είναι ευεργετική σε υγιή άτομα, αλλά και ότι μπορεί, σε μεγάλες ποσότητες, να προκαλέσει οξείες και χρόνιες βλάβες. Το κρασί είναι το πιο ευρέως καταναλισκόμενο ποτό από τον άνθρωπο, με σκοπό την ευχαρίστηση, εδώ και δέκα χιλιάδες χρόνια.^[62]

ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ

Υπάρχουν πολλές αναφορές στην Αγία Γραφή σχετικά με το κρασί ^[63-64]. Η λέξη οίνος προέρχεται από το όνομα του Έλληνα Θεού Διόνυσου, που ενθάρρυνε του αρχαίους να λατρεύουν το κρασί.^[65] Σύμφωνα με την Αγία Γραφή (Παλαιά Διαθήκη, Γένεσις 9), ο Νώε πήρε μαζί του στην Κιβωτό αποκόμματα αμπέλου και αμέσως μετά τον Κατακλυσμό φύτεψε έναν αμπελώνα και στη συνέχεια έφτιαξε κρασί ^[64]. Το κόκκινο κρασί εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και σήμερα στη Χριστιανική τελετή της Θείας Ευχαριστίας ως το αίμα του Ιησού Χριστού.^[65]

Στα μισά της τρίτης χιλιετίας, στο αρχαίο κείμενο του Ταλμούδ, υπάρχει ένας έπαινος του κρασιού: «ο οίνος είναι το καλύτερο γιατρικό, αν λείπει, μπορεί να υπάρχει ανάγκη για φάρμακα». Ο Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.), συνέστησε το κρασί για τη θεραπεία των πληγών, για τη φυσική ενίσχυση του οργανισμού, καθώς και ως διουρητικό, καθαρτικό και ηρεμιστικό.^[62] Ο Αριστοφάνης (448-385π.Χ.) αναφέρει χαρακτηριστικά: «Γρήγορα, φέρτε μου ένα ποτήρι κρασί, έτσι ώστε να μπορέσει να υγρανθεί το μυαλό μου και να πω κάτι έξυπνο». ^[64] Τα πρώτα αυθεντικά ιστορικά στοιχεία σχετικά με την παραγωγή αυτού του υγρού των ευγενών που προέρχεται από το κρασί είναι από την εποχή του Περσικού Πολέμου σύμφωνα με τον Sir John Malcolm (1789-1833).^[62]

Η άμπελος είναι το αρχαιότερο καλλιεργήσιμο φυτό.^[62] Τα αμπέλια ανήκουν σε ένα ενιαίο γένος, με το όνομα Vitis, της οικογένειας Vitaceae, η οποία περιέχει 12-14 γένη, που διαθέτουν περίπου 1000 είδη. Το γένος Vitis έχει μια κατανομή εύκρατων περιοχών, σε μεγαλύτερο βαθμό στο Βόρειο ημισφαίριο αλλά και στην Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Νότια Αμερική και Νότια Αφρική. Εντούτοις, μετά την εποχή των παγετώνων οι πληθυσμοί αυτών των αμπελιών μεταφέρθηκαν προς θερμότερες ζώνες κυρίως στην περιοχή του Νότιου Καύκασου, όπου εκεί μεταξύ Εύξεινου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας γεννήθηκε η αυτή η οиноφόρος άμπελος. Οι πιο γνωστοί αμπελιοκαλλιεργητές θεωρούνται οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Μεταγενέστερα οι γνώσεις αμπελουργίας και οινοποιίας μεταφέρθηκαν στους

Αιγύπτιους, τους πληθυσμούς της Μικρασίας και του Ελλαδικού χώρου και εξαπλώθηκαν στη Μεσόγειο. ^[65]

ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ

Περισσότερες από 500 ενώσεις έχουν αναγνωρισθεί στο κρασί μέχρι στιγμής από τις οποίες οι 160 είναι εστέρες. Τα κρασιά περιέχουν γενικά 0,8-1,2g αρωματικών ενώσεων ανά λίτρο, εκ των οποίων πιο κοινά είναι οι ζυμωμένες αλκοόλες, διάφορα πτητικά οξέα και οι εστέρες λιπαρών οξέων. Ενώσεις που είναι παρούσες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως είναι τα καρβονύλια, οι φαινόλες, οι λακτόνες, τα τερπένια, οι ακετάλες, οι υδατάνθρακες, το θείο και αζωτούχες ενώσεις, είναι πιο σημαντικές ποιοτικά και συμβάλλουν σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το άρωμα του κρασιού. Η γεύση, οφείλεται κατά κύριο λόγο στις λίγες ενώσεις που εμφανίζονται ξεχωριστά σε συγκεντρώσεις >100mg/L. Αυτές περιλαμβάνουν το νερό, την αιθανόλη, τα οργανικά οξέα, τα σάκχαρα και τη γλυκερίνη. Οι ταννίνες εμφανίζονται στο κόκκινο κρασί και σπάνια, σε σημαντικές ποσότητες στο άσπρο κρασί, εκτός και αν η ωρίμανση έχει πραγματοποιηθεί σε δρύινα βαρέλια. ^[63]

Το νερό είναι το κύριο χημικό συστατικό των σταφυλιών και του κρασιού και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τον καθορισμό των θεμελιωδών χαρακτηριστικών του κρασιού. Είναι απαραίτητο συστατικό σε πολλές χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των σταφυλιών, στη ζύμωση του χυμού και στη γήρανση του κρασιού. ^[63]

Τα κύρια σάκχαρα του σταφυλιού είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Απαντώνται σε περίπου ίσες αναλογίες κατά την ωρίμανσή του, ενώ υψηλότερα ποσά φρουκτόζης έχουν συνήθως τα υπερώριμα σταφύλια. Η σακχαρόζη σπάνια βρίσκεται σε *Vitis Vinifera* σταφύλια, ενώ υπάρχουν και άλλα σάκχαρα αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες. Γενικώς, η γλυκύτητα επηρεάζεται και από άλλα συστατικά όπως η αιθανόλη, οξέα και ταννίνες. Τα σάκχαρα είναι απαραίτητα όχι μόνο για τη ζύμωση και την παραγωγή αλκοόλης αλλά και γιατί μεταβολίζονται σε ανώτερες αλκοόλες, εστέρες λιπαρών οξέων και αλδεΐδες που χαρίζουν στα διαφορετικά κρασιά το δικό τους αρωματικό χαρακτήρα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων μπορούν να αυξήσουν τη μεταβλητότητα των αρωματικών ενώσεων. Η συγκέντρωση πολυσακχαριτών στο κρασί είναι γενικά χαμηλή. Οι πολυσακχαρίτες είναι μερικώς διαλυτοί στο νερό και εξαγονται στο χυμό κατά τη θραύση και την πίεση, με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων. ^[63]

Η πιο σημαντική και πιο άφθονη αλκοόλη στο κρασί είναι η αιθανόλη. Η αιθανόλη είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα, τη γήρανση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού. Υπό κανονικές συνθήκες ζύμωσης, η αιθανόλη μπορεί να συσσωρεύεται σε ποσοστό 14-15%, αλλά συνήθως οι συγκεντρώσεις αιθανόλης στο κρασί κυμαίνονται μεταξύ 10-13%. Οι κύριοι παράγοντες που ελέγχουν την παραγωγή αιθανόλης είναι τα σάκχαρα, η θερμοκρασία και το στάδιο της ζύμωσης. Η αιθανόλη κατά την παραγωγή της στη διάρκεια της ζύμωσης, περιορίζει την ανάπτυξη των περισσότερων

μικροοργανισμών, επιτρέποντας έτσι στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, να κυριαρχήσει στη διαδικασία της ζύμωσης. Η μεθανόλη είναι μια δευτερεύουσα αλκοόλη που απαντάται σε πολύ μικρές ποσότητες στο κρασί (0,1-0,2 g/L) και δεν έχει άμεση αισθητική επίδραση. Τα οξέα στο κρασί, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα πτητικά και τα σταθερά. Η πρώτη αναφέρεται σε οξέα που μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα μέσω απόσταξης, ενώ η δεύτερη αναφέρεται στα καρβοξυλικά οξέα. Το πιο κοινό πτητικό οξύ που απαντάται στο κρασί είναι το οξικό οξύ. Ποσοτικά, τα καρβοξυλικά οξέα όπως το τρυγικό, το μηλικό, το γαλακτικό, το ηλεκτρικό, το οξαλικό, το φουμαρικό και το κιτρικό οξύ ρυθμίζουν το pH του κρασιού.

Οι φαινόλες είναι μια μεγάλη και σύνθετη ομάδα ενώσεων με ιδιαίτερη σημασία για τα χαρακτηριστικά και την ποιότητα του κόκκινου κρασιού. Η συγκέντρωσή τους σε λευκό κρασί είναι πολύ χαμηλότερη.^[63] Ένα τυπικό μπουκάλι κόκκινο κρασί περιέχει περίπου 1,8 g / L ολικές πολυφαινόλες, ενώ το λευκό κρασί περιέχει μόνο περίπου 0,2 g / L έως 0.3 g / L. Οι περισσότερες από τις φαινολικές ενώσεις προέρχονται από την εκχύλιση που γίνεται στο δέρμα ή στους σπόρους κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Οι φαινόλες και οι συναφείς φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη σχετική πίκρα, τη στιφάδα, το χρώμα του κρασιού, καθώς και για την αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική του δράση.^[66] Τα πιο συνηθισμένα φλαβονοειδή του κρασιού είναι οι φλαβονόλες και οι κατεχίνες, ενώ στα κόκκινα κρασιά, οι ανθοκυανίνες.^[63]

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ

Μεταξύ των μικροσυστατικών που φαίνεται να έχουν σημαντικές ιδιότητες ως αντιοξειδωτικά των κυττάρων ή «καθαριστές» των ελεύθερων ριζών είναι οι πολυφαινόλες που απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα σταφύλια και στα κρασιά: 12,6-22,4 mmol/L.^[67] Οι πολυφαινόλες των κρασιών μπορούν να ταξινομηθούν σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή ενώσεις. Στα φλαβονοειδή κατατάσσονται οι ανθοκυανίνες και μη φλαβονοειδή είναι το υδροξυκιναμικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, οι ταννίνες και τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη).^[68]

Επαρκή αποδεικτικά στοιχεία υποστηρίζουν μια σημαντική αντίστροφη σχέση μεταξύ τακτικής και μέτριας κατανάλωσης κρασιού και του αγγειακού κινδύνου, ιδιαίτερα για το κόκκινο κρασί, ενώ μια παρόμοια σχέση έχει αναφερθεί για τη κατανάλωση μπίρας, με χαμηλότερο όμως βαθμό προστασίας. Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι κυρίως το κόκκινο κρασί μπορεί να προστατεύσει ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις, αθηροσκλήρωση, υπέρταση, ορισμένες μορφές καρκίνου, διαβήτη τύπου II, νευρολογικές διαταραχές και μεταβολικό σύνδρομο.^[69]

Προστασία από καρδιαγγειακό κίνδυνο

Η κατανάλωση κρασιού και προϊόντων γλεύκους έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο. Τα οφέλη από την κατανάλωση κρασιού φαίνεται να είναι περισσότερα από άλλα αλκοολούχα ποτά. Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες των σταφυλιών μπορούν να μειώσουν την αθηροσκλήρυνση με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της οξείδωσης της LDL και άλλες ευνοϊκές επιδράσεις στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, τη βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργία, μείωση της αρτηριακής πίεσης, αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μείωση της φλεγμονής και ενεργοποίησης πρωτεϊνών που εμποδίζουν την κυτταρική γήρανση.^[70]

Το 1819, έγινε μια πρώτη επιδημιολογική παρατήρηση από τον Ιρλανδό ιατρό Samuel Black ότι ο πληθυσμός της Γαλλίας παρουσιάζει με χαμηλότερη συχνότητα στεφανιαία καρδιακή νόσο, παρά τη σχετικά υψηλή διαιτητική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων. Το 1979, οι St Leger et al, περιέγραψαν πρώτοι μια ισχυρή αντίστροφη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης κρασιού και τον κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο, με βάση κλινικές δοκιμές σε διάφορες χώρες. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «γαλλικό παράδοξο» και αναφέρεται στην παρατήρηση ενός παραδόξως χαμηλού επιπολασμού θανάτων από στεφανιαία-καρδιακή νόσο στον Γαλλικό πληθυσμό παρά την υψηλή πρόσληψη διαιτητικής χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων. Αυτό εξηγείται από την τακτική κατανάλωση κρασιού στους πληθυσμούς της Γαλλίας, αναφερόμενοι σε μια ήπια ως μέτρια κατανάλωση κρασιού. Οι περισσότερες από τις ευεργετικές δράσεις του κρασιού στην καρδιαγγειακή νόσο έχουν αποδοθεί στην παρουσία της ρεσβερατρόλης αλλά και άλλων πολυφαινολών στο κρασί.^[68, 71]

Η ρεσβερατρόλη (trans – 3,5,4'- τριυδροξυστιλβένιο), ένα παράγωγο στυλβενίου, είναι μια από τις πιο βιολογικά δραστικές πολυφαινόλες που περιέχονται στο κρασί. Η ρεσβερατρόλη είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που παράγεται από το ένζυμο συνθετάση του στυλβενίου. Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως φυτοαλεξίνη, μια αντιμικροβιακή ουσία που συντίθεται στα φυτά ως απόκριση στην μόλυνση ή σε άλλες στρεσογόνες καταστάσεις όπως η στέρση θρεπτικών συστατικών. Η ένωση αυτή προσέλκυσε περισσότερο επιστημονικό ενδιαφέρον από το 1992, όπου έγιναν προσπάθειες για να εξηγήσουν μερικές από τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του κρασιού.^[68] Η ρεσβερατρόλη έχει δύο ισομερείς μορφές, την *cis* και την *trans*. Η *trans* ρεσβερατρόλη είναι αυτή που προσέλκυσε το μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω ισχυρότερης αντικαρκινικής και αντιφλεγμονώδους ιδιότητας αλλά και μεγαλύτερη μείωση στο σάκχαρο του αίματος.^[72] Απαντάται συνήθως στο δέρμα των σταφυλιών αλλά και στα κρασιά. Η περιεκτικότητά της στα κρασιά διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και συνήθως το κόκκινο κρασί περιέχει περισσότερη ποσότητα. Τα κόκκινα κρασιά περιέχουν περίπου 0,29 – 1,89 mg ρεσβερατρόλης ανά ποτήρι, ενώ τα λευκά 0,01-0,257mg ανά ποτήρι.^[72]

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, σε ατομικά ή μοριακά τροχιακά και αυτό τους δίνει σημαντικό βαθμό δραστικότητας. Οι ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο (reactive oxygen species,

ROS) αντιπροσωπεύουν την πιο σημαντική κατηγορία για τα συστήματα επιβίωσης. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου προς μοριακό οξυγόνο, σχηματίζει τη ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻), που θεωρείται και η πρωτογενής ενεργός ρίζα οξυγόνου. Μπορεί να αλληλεπιδράσει περαιτέρω με άλλα μόρια, είτε άμεσα, είτε μέσω ένζυμο ή μέταλλο-καταλυόμενες διεργασίες και να παράγει δευτερεύουσες ROS, όπως υπεροξείδιο του υδρογόνου ή λιπιδικά υπεροξείδια. Οι ROS έχει φανεί να έχουν κάποιο ρόλο σε καρδιαγγειακές νόσους, όπως στην αθηροσκλήρωση, στην ισχαιμική καρδιακή νόσο, στην υπέρταση, στις καρδιομυοπάθειες, στην καρδιακή υπερτροφία και στην συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, μέσω πρόκλησης οξειδωτικού στρες.^[68] Η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μορίου εξαρτάται από την ικανότητά του να αντιδρά απευθείας με τις ROS ή να αλληλεπιδρά με τα ενζυματικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο σχηματισμό ROS.

Πολλές πολυφαινόλες του κρασιού έχουν άμεσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (δηλαδή, δρουν ως αναγωγικά μέσα) και μπορεί να αντιδράσουν με αντιδραστικά είδη και να σχηματίζουν προϊόντα με πολύ χαμηλότερη αντιδραστικότητα ή έμμεσα με το να επηρεάσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση με την αύξηση της ικανότητας των ενδογενών αντιοξειδωτικών, ή αναστέλλοντας ενζυματικά συστήματα που εμπλέκονται στο σχηματισμό ROS.^[68] Η ρεσβερατρόλη ως αυθεντικό αντιοξειδωτικό, δρα ως «καθαριστής» για τις ενδοκυττάριας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Επάγει τη σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε περιπτώσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης της καρδιάς, του εγκεφάλου και των νεφρών έτσι ώστε να μειώνονται τα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Επίσης, ρυθμίζει την ομοιόσταση του οξειδοαναγωγικού συστήματος με τη διατήρηση των επιπέδων διάφορων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγάση της γλουταθειόνης και τρανσφεράση-S- γλουταθειόνης. Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει in vitro την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ρεσβερατρόλη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) που απαντώνται στην LDL. Μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού ώστε να αυξηθεί η πρόσληψη ρεσβερατρόλης, θα μπορούσε, συνεπώς, να έχει μια σημαντικά καρδιοπροστατευτική επίδραση και μείωση του οξειδωτικού στρες.^[72]

Αντιθρομβωτική δράση

Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος των πολυφαινολικών ενώσεων του κόκκινου κρασιού, αφού έχει φανεί ότι η επίδραση κόκκινου κρασιού μειώνει την επαγόμενη από το ADP συγκόλληση αιμοπεταλίων. Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι τα κρασιά και ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί, καθώς επίσης τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη μπορεί να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη λειτουργία των αιμοπεταλίων.^[73] Όσον αφορά στην επίδραση των φλαβονοειδών έχει φανεί η αντισυγκολλητική τους δράση στα αιμοπετάλια. Φαίνεται ότι η επικατεχίνη είναι πιο αποτελεσματική από την κατεχίνη στην αναστολή της επαγόμενης από αραχιδονικό οξύ συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.^[73]

Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) είναι ο ισχυρότερος μεσολαβητής της φλεγμονής, απαραίτητος για την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τη σύνδεσή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Εμπλέκεται στην αθηρογένεση η οποία

προέρχεται κατά την οξείδωση της LDL και προκαλεί αιτία πρόκλησης της φλεγμονής. Μελέτες σε ζώα έδειξαν την προστατευτική δράση του ανταγωνιστή του PAF έναντι της αθηροσκλήρυνσης.^[74] Η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, που αποτελεί σημαντική συμβολή στη διαδικασία της αρτηριοσκλήρυνσης. Τα αιμοπετάλια μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας σχηματισμού θρόμβου και της συσσώρευσής τους, θα μπορούσαν να θέσουν σε κίνηση την διαδικασία της αγγειακής απόφραξης.^[72] Κατά τη θεραπεία με ρεσβερατρόλη επιτεύχθηκε μία δοσοεξαρτώμενη μείωση της διαδικασίας συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων μέσω της αναστολής του PAF. Η αναστολή του PAF εξαρτάται από τη βιολογική δραστηριότητα των κρασιών, η οποία οφείλεται στο σύνολο των πολικών λιπιδίων. Η ρεσβερατρόλη του κόκκινου κρασιού εμφανίζει και ανασταλτική δράση κατά της θρομβίνης και της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP).^[73-74]

Αντικαρκινικές Ιδιότητες

Ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της αιθανόλης, λόγω του ότι επιφέρει μια αύξηση της HDL χοληστερόλης εξηγεί μόνο την καρδιοπροστατευτική δράση των οινοπνευματώδων ποτών, ενώ αντίθετα η αιθανόλη δεν αποτελεί χημειοπροστατευτικό παράγοντα και έτσι δεν εξηγεί τις αντικαρκινικές ιδιότητες που εμφανίζει το κόκκινο κρασί. Είναι πιθανόν, η ευεργετική αντικαρκινική επίδραση του κρασιού, κυρίως του κόκκινου, να οφείλεται στην παρουσία άλλων ουσιών εκτός της αιθανόλης, όπως των πολυφαινόλων.^[75] Τα τελευταία χρόνια, πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι πολυφαινόλες από το κόκκινο κρασί, η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη, η κατεχίνη και το γαλλικό οξύ, είναι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες.

Η κατανάλωση περίπου ενός ποτηριού κρασί ημερησίως συνδέθηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης οισοφάγου Barrett, πρόδρομο του αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου, σε σύγκριση με τους βαρείς πότες ή μη πότες. Το κρασί, μέσω των πολυφαινόλων που περιέχει, μπορεί να αναστέλλει την καρκινογένεση λόγω της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιμεταστατικής του δράσης, αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά και ως αντιαγγειογόνο και προαποπτωτικός παράγοντας. Διαμορφώνει τη μεταγωγή σήματος, την ανοσοαπόκριση, παράγοντες μεταγραφής, παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες, ιντερλευκίνες, σύνθεση της προσταγλανδίνης και ρύθμιση των πρωτεϊνών. Ένα μεγάλο ποσοστό της βιβλιογραφίας σχετικά με την πρόληψη του καρκίνου μέσω της κατανάλωσης οίνου εστιάζεται σε μια ένωση κυρίως, τη ρεσβερατρόλη. Αυτό το στηρίζουν στην ικανότητά της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων *in vitro*, καθώς και εμφυτευμένων όγκων, συνήθως σε πειράματα με ποντίκια.^[69] Η προληπτική δράση της ρεσβερατρόλης έχει αποδοθεί σε διάφορα μονοπάτια. Μπορεί δηλαδή να εμπλέκεται είτε στη διαδικασία έναρξης ή προαγωγής και εξέλιξης του καρκίνου.

Η ρεσβερατρόλη αναστέλλει το CYP1A1, αναστέλλοντας την μεταβολική ενεργοποίηση προκαρκινογόνων, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει είτε από την άμεση αναστολή της ενζυματικής δραστηριότητας είτε από την αναστολή της μεταγωγής σήματος. Η προληπτική δράση της ρεσβερατρόλης κατά του καρκίνου μπορεί να αποδοθεί και στις αντιοξειδωτικές τις ιδιότητες. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να μειώνει την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται

από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα επίπεδα της 8-υδροξυ-20-δεοξυγουανωσίνης, δείκτη οξειδωτικής βλάβης του DNA, μειώνονται επίσης *in vivo* με τη χορήγηση ρεσβερατρόλης. Επίσης, η ρεσβερατρόλη εμφανίζει ευεργετικές ιδιότητες ενάντια σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω της αναστολής της έκφρασης της κυκλοσπορίνης (COX1 και COX2), κάτι που επιφέρει αναλγητική δράση.^[72]

Αρκετές μελέτες έχουν αποδώσει την αντικαρκινική δράση της ρεσβερατρόλης την επίδρασή της στον κυτταρικό κύκλο, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.^[75] Η ρεσβερατρόλη συγκεκριμένα επάγει την απόπτωση σε διάφορες κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των επιδερμικών κυττάρων JB6, των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη. Το p53 είναι ένα από τα πιο σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Είναι ζωτικής σημασίας για την απόπτωση και έλλειψη της έκφρασης του γονιδίου p53, ή της λειτουργίας του, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο σχηματισμού όγκων. Η ρεσβερατρόλη επάγει την p53-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση καθώς και την απόπτωση σε κύτταρα που εμφανίζουν επιθετικού τύπου p53 αλλά όχι σε κύτταρα που υπάρχει ανεπάρκεια p53.^[76]

Προκλινικές μελέτες που στόχευαν στην κατανόηση του ρόλου της *trans* ρεσβερατρόλης έδειξαν ότι οι χημειοπροστατευτικές τις δράσεις οφείλονται στην απόπτωση, στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στις αντιαγγειογενετικές ιδιότητες. Επίσης μελέτες δείχνουν ότι αναστέλλει την έκφραση των μεθυλοτρανσφερασών DNA και της προσταγλανδίνης PGE2. Σε έρευνα που διενεργήθηκε σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι ελπιδοφόρα ως προς τη δράση της *trans* ρεσβερατρόλης στη μεθυλίωση. Επίσης η χορήγηση *trans* ρεσβερατρόλης μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης όγκων μαστού κατά 45% σε πειράματα με αρουραίους.^[77]

Άλλα οφέλη για την υγεία

Η χρόνια κατανάλωση μέτριας ποσότητας κρασιού βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνει τον κίνδυνο για εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II. Μελέτη σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, έδειξε ότι μετά από συστηματική μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού (για δύο εβδομάδες), η μεσολαβούμενη από την ινσουλίνη διαθέσιμη γλυκόζη σε ολόκληρο το σώμα αυξήθηκε κατά 43%.^[78] Το κόκκινο κρασί που είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες, σε αντίθεση με άλλου είδους αλκοολούχων ποτών, βελτιώνει το μεταβολισμό της γλυκόζης.^[79] Η ρεσβερατρόλη, αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα της γλυκόζης GLUT-4, ρυθμίζει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και ταυτόχρονα μειώνει τα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα, τη συσσώρευση του λίπους και τα επίπεδα του IGF-1.^[72]

Η ρεσβερατρόλη έχει και ορισμένες νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Έχει αναφερθεί ότι η ρεσβερατρόλη θα μπορούσε να είναι προστατευτική ενάντια στη Νόσο Huntington, νόσο Alzheimer και νόσο του Parkinson.^[72]

Κρασί και μακροζωΐα : Σημαντικός αριθμός μελετών δείχνει ότι τόσο το κόκκινο κρασί όσο και η ρεσβερατρόλη επάγουν γονίδια που σχετίζονται με τη μακροζωΐα, όπως τα SIRT1 και FoxOs. Αυτό οφείλεται στο ότι τα γονίδια αυτά μιμούνται τις δράσεις του

οργανισμού στην κατάσταση νηστείας, δηλαδή μειώνουν τη γλυκόζη αίματος, την ινσουλίνη, τον αυξητικό παράγοντα IGF-1 και προκαλούν και μια αύξηση στα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Στα θηλαστικά, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να διαδραματίζει καίριο ρόλο στην καταπολέμηση εκφυλιστικών ασθενειών, με αποτέλεσμα την παράταση της διάρκειας της ζωής. Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να έχει ευεργετική δράση σε πολλές ασθένειες που προκαλούν πρόωμη γήρανση όπως καρκίνος, καρδιαγγειακά, φλεγμονή, βλάβη του εγκεφάλου, απώλεια ακοής, ανορεξία και τραυματισμοί σε διάφορους ιστούς. Η ρεσβερατρόλη αυξάνει τη μακροζωία μέσω του SIRT1, το οποίο ενεργοποιείται με το NAD⁺. Το SIRT1 στη συνέχεια αλληλεπιδρά με ένα αντι-γηραντικό παράγοντα μεταγραφής, το FoxO1, με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου επιβίωσης.^[72]

Κρασί και καρκίνος του προστάτη

Οι μελέτες που αφορούν τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, φέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, σύμφωνα με το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, ότι η κατανάλωση κάθε επιπρόσθετου ποτηριού κόκκινο κρασί την εβδομάδα, επιφέρει 6% μείωση στον σχετικό κίνδυνο. Επίσης η συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζει ότι επέρχεται μια μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, με την αύξηση των επιπέδων κατανάλωσης κόκκινου κρασιού. Αυτό το στηρίζουν στο γεγονός ότι το κόκκινο κρασί περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυφαινόλων.^[80]

Οι πολυφαινόλες, σε πειραματικές μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro* σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη (LNCaP, PC3, DU145). Τα τρία φλαβονοειδή (κατεχίνη, επικατεχίνη, κερκετίνη) είναι σημαντικοί αναστολείς της ανάπτυξης στα κύτταρα. Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό στις υψηλότερες συγκεντρώσεις μόνο (PC3 κύτταρα) ή είναι εντελώς αναποτελεσματική (LNCaP κύτταρα). Σε αντίθεση, η ρεσβερατρόλη είναι η πιο ενεργή από τις υπόλοιπες πολυφαινόλες στα DU145 κύτταρα και ακολουθεί η κερκετίνη, η επικατεχίνη και η κατεχίνη. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των πολυφαινόλων στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μπορεί να είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Αυτό διερευνήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους: την προστασία από την τοξική επίδραση του H₂O₂ και τη δέσμευση των ROS μετά από μιτογόνο διέγερση. Στα PC3 κύτταρα, μια σημαντική μεταβολή της δράσης του H₂O₂ μετά την επώαση με πολυφαινόλες, καθώς και μια αξιοσημείωτη μείωση των ROS, υποδεικνύοντας μια δέσμευση των ελευθέρων ριζών.^[68]

Αντιθέτως, σε άλλες προοπτικές μελέτες βρέθηκε μέτρια αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, που σχετίζεται με την υψηλή κατανάλωση λευκού κρασιού.^[81] ή ακόμα και με 4 ποτήρια λευκό κρασί την εβδομάδα.^[82] Όσον αφορά στο κόκκινο κρασί, άνδρες που κατανάλωναν αμετάβλητη ποσότητα κρασιού, μικρότερη ή ίση από 4 ποτήρια την εβδομάδα, σε περίοδο δέκα χρόνων και είχαν ηλικία <65 ετών, παρουσίασαν ελαφρώς χαμηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη. Άνδρες που κατανάλωναν στην ίδια χρονική περίοδο >4 ποτήρια κόκκινου κρασιού την

εβδομάδα, παρουσίασαν καθόλου ή ελάχιστα αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του προστάτη.^[83]

Πλήθος μελετών όμως, υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη.^[84-85] Τα αποτελέσματα έρευνας στην Καλιφόρνια δεν υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η κατανάλωση κόκκινο κρασιού μειώνει τον κίνδυνο για καρκίνο του προστάτη, τουλάχιστον όχι σε επίπεδα μέτριας κατανάλωσης (1-2 ποτήρια την ημέρα). Αν και το κόκκινο κρασί αποτελεί μια σχετικά πλούσια πηγή ρεσβερατρόλης, μεταβολίζεται πολύ γρήγορα σε συζευγμένες μορφές μετά την κατάποση, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα πειραματόζωα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι προηγούμενες μελέτες αφορούσαν λευκούς άνδρες, ενώ η συγκεκριμένη αναφέρεται σε Αφροαμερικάνους, οι οποίοι έχουν και υψηλότερο επιπολασμό της νόσου αυτής.^[86]

Τρίτο μέρος : Κολοκυθόσπορος και Προστατευτικές Ιδιότητες

ΣΥΣΤΑΣΗ

Η κολοκύθα είναι ένα γνωστό βρώσιμο φυτό του γένους *Cucurbita* που ανήκει στην οικογένεια *Cucurbitaceae*.^[87] Κατατάσσεται στα είδη *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima* και *Cucurbita mixta*, ανάλογα με την υφή και το σχήμα των βλαστών της.^[88] Η κολοκύθα είναι ετήσιο φυτό και ανήκει στα δικοτυλήδονα κηπευτικά. Μπορεί να καλλιεργείται τόσο στο επίπεδο της θάλασσας όσο και σε υψηλά υψόμετρα. Είναι ανθεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά όχι σε σοβαρούς παγετούς. Αποτελείται από ένα εύκαμπτο χυμώδες στέλεχος με τρίφυλλα φύλλα που αναρριχώνται. Είναι γνωστή για τους βρώσιμους σπόρους, τα φρούτα και τα λαχανικά της.^[87] Οι κολοκυθόσποροι είναι ένα δημοφιλές σνακ σε αρκετές χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα. Καταναλώνονται ωμοί ή ψημένοι (αλατισμένοι ή όχι) και χρησιμοποιούνται στο μαγείρεμα και το ψήσιμο ως συστατικό στο ψωμί, τα δημητριακά, σαλάτες και γλυκά.^[88]

Το πιο σημαντικό μέρος της κολοκύθας είναι οι χαμηλοί σε λιπαρά και πλούσιοι σε πρωτεΐνες σπόροι της. Το δεύτερο σημαντικό μέρος της είναι ο καρπός της : ο όχι τόσο ώριμος ψήνεται ως λαχανικό, ενώ το ώριμο φρούτο είναι γλυκό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατασκευή ειδών ζαχαροπλαστικής και ποτών, πολλές φορές αλκοολούχων. Η κολοκύθα έχει θεωρηθεί ως ευεργετική για την υγεία, λόγω του ότι περιέχει διάφορα βιολογικά ενεργά συστατικά όπως πολυσακχαρίτες, π-αμινοβενζοϊκό οξύ, σταθερά έλαια, στερόλες, πρωτεΐνες και πεπτίδια. Ο ώριμος καρπός της αποτελεί μια πολύ καλή πηγή β-καροτένιου και γ-αμινοβουτυρικού οξέος, ενώ εμφανίζει μέτρια περιεκτικότητα σε βιταμίνες, υδατάνθρακες και μέταλλα. Οι σπόροι της κολοκύθας (*Cucurbita* spp.) εκτιμώνται για την πλούσια περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, καθώς και για τη χρήσιμη ποσότητα του απαραίτητου λιπαρού οξέος, του λινολεϊκού που περιέχεται. Περιέχουν επίσης εξαιρετικά υψηλά ποσοστά απαραίτητων αμινοξέων, καθώς και διάφορα βασικά μικροστοιχεία, όπως κάλιο, χρώμιο και νάτριο. Οι σπόροι της κολοκύθας είναι μια καλή πηγή μαγνησίου, ψευδαργύρου, χαλκού, μολύβδου και

σεληνίου. Από τα φύλλα της κολοκύθας έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός ενώσεων, όπως πολυσακχαρίτες, φαινολικοί γλυκοζίτες, πρωτεΐνες και ελεύθερα λιπαρά οξέα (NEFA).^[87] Επιπλέον, τα λάδι από τους σπόρους της κολοκύθας κερδίζει σήμερα ευρεία αποδοχή όχι μόνο ως βρώσιμο έλαιο, αλλά και για τις διατροφικές του ιδιότητες.^[88]

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Παρότι η κολοκύθα είναι ένα πολύ γνωστό εδώδιμο φυτό, τα περισσότερα μέρη αυτού του φυτού χρησιμοποιούνται σε παραδοσιακά συστήματα της ιατρικής σε όλο τον κόσμο και παρά το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων έχουν απομονωθεί από κολοκύθα, μόνο ορισμένα από αυτά εμφανίζουν βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες.^[87]

Αντιδιαβητική δράση

Η κολοκύθα φαίνεται να έχει αντιδιαβητική δράση, ενώ τοπικοί θεραπευτές συνιστούν την κατάποση ακατέργαστου υδατικού εκχυλίσματος φρούτων κολοκύθας για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Σε διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η κολοκύθα εμφανίζει οξεία υπογλυκαιμική δράση, σε υπεργλυκαιμικά κουνέλια, σε διαβητικά κουνέλια και σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II. Οι Xia και Wang έδειξαν ότι η κολοκύθα εμφανίζει υπογλυκαιμική δραστηριότητα σαν το πρότυπο φάρμακο τολβουταμίδη σε υγιή ζώα με παροδική υπεργλυκαιμία ή σε ήπια διαβητικά ζώα, αλλά όχι σε ζώα με σοβαρή μορφή διαβήτη. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να οφείλονται είτε στην αύξηση της έκκρισης της παγκρεατικής ινσουλίνης είτε στην απελευθέρωση της ινσουλίνης σε δεσμευμένη μορφή.^[89] Η D-chiro-ινοσιτόλη εντοπίστηκε στην κολοκύθα (*Cucurbita ficifolia*) και έχει θεωρηθεί ως μεσολαβητής της δράσης της ινσουλίνης, όπως και οι φυτοχημικές φαινόλες της κολοκύθας έχουν επίσης αντιδιαβητικές ιδιότητες αφού αναστέλλουν την β-γλυκοσιδάση και την α-αμυλάση. Έχουν εξεταστεί, αφού είχαν απομονωθεί, πρωτεΐνες που ήταν συνδεδεμένες σε πολυσακχαρίτες των φρούτων της κολοκύθας και φάνηκε ότι προκαλούν μια αύξηση της ινσουλίνης ορού μειώνοντας τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και βελτιώνοντας την ανοχή της γλυκόζης σε ινσουλινοεξαρτώμενα άτομα.^[87]

Αντιοξειδωτική δράση

Διάφορα εκχυλίσματα κολοκύθας έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες που μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε προ-διαβητικούς, διαβητικούς και σε άτομα με αγγειακή βλάβη. Οι Xia και Wang, εκτός από την υπογλυκαιμική δράση, έδειξαν και το ρόλο του εκχυλίσματος κολοκύθας ως αντιοξειδωτικό μέσω ενός μηχανισμού κυτταροπροστασίας. Οι σπόροι της κολοκύθας έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη E (τοκοφερόλη), ένα αντιοξειδωτικό συστατικό. Σε μελέτες αναφέρεται ότι το εκχύλισμα κολοκύθας προκαλεί αύξηση της ηπατικής δραστηριότητας της

υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε ποντίκια και μείωση της συγκέντρωσης της μαλονδιαλδεϋδης.^[89]

Αντικαρκινική δράση

Οι δίαιτες με υψηλή περιεκτικότητα σε κολοκυθόσπορους έχουν συσχετισθεί με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στομάχου, του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Πιθανή αντικαρκινική δράση μπορεί να προκύψει και από διάφορες χρωστικές ουσίες των καροτενοειδών που ανευρίσκονται στο λάδι από τους σπόρους της κολοκύθας. Τα καροτενοειδή από τους σπόρους της κολοκύθας έχουν συνδεθεί με την πρόληψη του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, κάποιες πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί από τους σπόρους έχει αναφερθεί ότι προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης σε καρκινικές σειρές λευχαιμίας (K-562), αναστολή πολλαπλασιασμού του μελανώματος και καρκινικών κυττάρων κυρίως του πνεύμονα, παρουσιάζοντας ισχυρή κυτταροτοξικότητα αλλά και ως πρωτεΐνη που απενεργοποιεί τα ριβοσώματα.^[87]

Αντιμικροβιακή δράση

Πολλές φυσικές πηγές έχουν θεωρηθεί ως η καλύτερη επιλογή για την επιλογή νέων αντιμικροβιακών συστατικών. Ένα ευρύ φάσμα από αντιμικροβιακά στοιχεία έχουν απομονωθεί από την κολοκύθα. Το λάδι της κολοκύθας αναστέλλει τα : *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. ορότυπο *typhimurium enterica*, *Serratia marcescens* και *Staphylococcus aureus* σε συγκέντρωση 2,0% (v/v). Έχει δειχθεί ότι ένα πεπτίδιο από σπόρους κολοκύθας αναστέλλει την ανάπτυξη του *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* και *Mycosphaerella arachidicola*. Έχει αναφερθεί ότι τα εξιδρώματα από το φρούτο της κολοκύθας έχουν αντιμυκητιασικές ιδιότητες μέσω αναστολής των πρωτεασών των παθογόνων μυκήτων. Απομονώθηκε μια νέα πρωτεΐνη, η PR-1, από κολοκύθα, η οποία έχει αντιμυκητιασική δράση, χωρίς να είναι τοξική για τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.^[87]

Κολοκυθόσπορος και Καρκίνος του Προστάτη

Ένα από τα πιο κρίσιμα οφέλη για την υγεία που αποδίδεται στο λάδι από τους σπόρους της κολοκύθας είναι η δραστηριότητά του έναντι στην καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (BPH).^[88] Η καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (BPH) είναι ένα παθολογικό σύμπτωμα που εμφανίζεται συχνά στους ηλικιωμένους άνδρες.^[90] Ο κίνδυνος της εμφάνισης BPH αυξάνεται σε 40-50% στους άνδρες ηλικίας 51-60 ετών και σε πάνω από 80% σε άντρες άνω των 80. Ο προστάτης αδένας στα άτομα αυτά αυξάνεται υπερβολικά προκαλώντας μια διεύρυνση που εμποδίζει το άνοιγμα της ουροδόχου κύστης, με αποτέλεσμα την βραδύτητα στην ούρηση και στο άδειασμα της ουροδόχου κύστης. Αυτή η καλοήγη υπερπλασία του αδένα προκαλεί πίεση στην

ουρήθρα. Το αποτέλεσμα είναι ακράτεια ούρων και συχνουρία και άλλα άβολα συμπτώματα του ουροποιητικού. Το λάδι αλλά και το πλούσιο σε φυτοστερόλες εκχύλισμα των σπόρων της κολοκύθας περιέχουν σημαντικούς φυτοθεραπευτικούς παράγοντες για τη θεραπεία της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη και έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία των συμπτωματικών διαταραχών της ούρησης.^[91] Μειωμένη πίεση ουροδόχου κύστης και ουρήθρας και βελτίωση της λειτουργίας της ουροδόχου κύστης έχουν συνδεθεί με λιπιδικά συστατικά των κολοκυθόσπορων. Συμπληρώματα κολοκυθόσπορων φαίνεται να αναστέλλουν το σχηματισμό ή τη συσσωμάτωση κρυστάλλων και αυτό μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης πέτρας στην ουροδόχο κύστη.^[92] Επιπλέον, βρέθηκε ότι η πρόσληψη ολόκληρου εκχυλίσματος Styrian ελαίου από σπόρους κολοκύθας συσχετίζεται σε μειωμένα συμπτώματα σχετιζόμενα με την καλοήγη υπερπλασία του προστάτη.^[91]

Ο μηχανισμός δράσης για το λάδι από κολοκυθόσπορους είναι η αναστολή της 5- α -αναγωγάσης, ενός ενζύμου που μετατρέπει την τεστοστερόνη σε διυδροτεστοστερόνη (DHT), ένα ισχυρό ανδρογόνο που συμβάλλει στην ανάπτυξη του προστάτη.^[90]

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα της β-σιτοστερόλης, ενός συστατικού που ανευρίσκεται στο λάδι του κολοκυθόσπορου, στην μείωση της δυσφορίας του προστάτη. Η βήτα-σιτοστερόλη πιστεύεται ότι δρα στο ίδιο ένζυμο αναστέλλοντας την παραγωγή της DHT και την περαιτέρω ανάπτυξη του προστάτη αδένος. Μια άλλη μελέτη σε LNCaP κύτταρα καρκίνου του προστάτη έδειξε ότι η βήτα-σιτοστερόλη οδηγεί σε μείωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων κατά 24% και προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων.^[93]

Ένας άλλος λόγος για το αξιοσημείωτο όφελος των ελαίων κολοκύθας είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε ω -6, λινελαϊκό οξύ, ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ. Τα ω -6 έχει φανεί ότι μειώνει τα συμπτώματα της καλοήθους υπερπλασίας και τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη. Επηρεάζουν πολλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής των ορμονών του φύλου δίνοντας στο σώμα την ευκαιρία να διορθώσει τυχόν ανισορροπίες στα επίπεδά τους. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα στις σωστές αναλογίες (ω -6, ω -3) παράγουν φυσικά στεροειδή του σώματος συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, καθώς επίσης εμπλέκονται στην παροχή οξυγόνου στα κύτταρα, ώστε να μην μετατραπούν σε καρκινικά.^[94] Τέλος, ο συνδυασμός ελαίου από κολοκυθόσπορο και φοινικέλαιο μπορεί να συμβάλει και στην μείωση του επιπέδου του PSA στον ορό.^[90]

Τέταρτο μέρος : Ένζυμα με αντιοξειδωτική δράση

Γλουταθειόνη - Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Γλουταθειόνη: Η γλουταθειόνη (GSH, γ-γλουτάμυλο-κυστεΐνο-γλυκίνη), είναι η πιο άφθονη μη- πρωτεϊνική θειόλη στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η σύνθεση αυτού του τριπεπτιδίου από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη καταλύεται από δύο κυτοσολικά ένζυμα. Στην πρώτη φάση από τη συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης (GCS) και στη δεύτερη φάση από την συνθετάση της γλουταθειόνης.^[95] Καθοριστικοί παράγοντες για τη ρύθμιση της σύνθεσης της γλουταθειόνης είναι η ενεργότητα της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, η διαθεσιμότητα της κυστεΐνης και την ανασταλτική ανάδραση της γλουταθειόνης. Λόγω του υπολείμματος της κυστεΐνης η GSH οξειδώνεται μη ενζυμικά σε δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG) από ηλεκτρονιόφιλες ουσίες (π.χ. ελεύθερες ρίζες, αντιδραστικά είδη οξυγόνου ή αζώτου) . Η έκκριση της GSSG από τα κύτταρα συμβάλλει σε μια καθαρή απώλεια της ενδοκυττάριας GSH. Οι κυτταρικές συγκεντρώσεις της GSH μειώνονται σημαντικά ως αποτέλεσμα στον πρωτεϊνικό υποσιτισμό, στο οξειδωτικό στρες, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις. Η συγκέντρωση των GSH + 2GSSG αντικατοπτρίζει συνήθως το σύνολο της γλουταθειόνης στα κύτταρα, ένα ποσό από το οποίο (έως 15%), μπορεί να είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες.^[96]

Στα θηλαστικά, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ κυτταρικού θανάτου και διαίρεσης βοηθά στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιστών και οργάνων. Μηχανισμοί που σχετίζονται με αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται σε σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση βλαβών, στον ανασυνδυασμό του DNA καθώς και στον κυτταρικό θάνατο. Ο όρος κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει την ισορροπία του NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ και GSH/GSSG και την σχέση μεταξύ διαφορετικών μεταβολιτών και τον έλεγχο του μεταβολισμού των κυττάρων.^[95] Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί δείκτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων και σε φυσιολογικές καταστάσεις είναι >10 .^[96]

Λόγω της δραστηριότητας της γλουταθειόνης και των υψηλών ενδοκυττάριας συγκεντρώσεών της (περίπου 10mM στο ήπαρ και σε διάφορα κακοήγη κύτταρα), η γλουταθειόνη εμπλέκεται στην προστασία των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η σύνθεση του DNA και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.^[95] Η βιοχημική απορρύθμιση της γλουταθειόνης σε διάφορες μορφές καρκίνου, έχει παρατηρηθεί σε όγκους ποντικών αλλά και ανθρώπων. Η γλουταθειόνη είναι σημαντική για τα καρκινικά κύτταρα, στην προστασία έναντι στη σχετιζόμενη με το μικροπεριβάλλον του όγκου επιθετικότητα, στη διαφυγή της απόπτωσης, στην ικανότητα αποικισμού και στην αντίσταση στα φάρμακα και την ακτινοβολία. Αυξημένα επίπεδα της γλουταθειόνης και αντίστασης σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες έχουν

παρατηρηθεί (σε ενώσεις που περιέχουν πλατίνη, αλκυλιωτικούς παράγοντες, ανθρακυκλίνες, αρσενικό).^[95]

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης: Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανακαλύφθηκε πρώτα από τον Mills και πρόκειται για ένα ένζυμο που προστατεύει τα ένζυμα από την αιμόλυση που προκύπτει κατά την οξειδωση. Αυτό το ένζυμο αρχικά ονομάστηκε υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η συνήθης ονομασία του ήταν GPX και σήμερα ονομάζεται GPX-1, αφού ανακαλύφθηκαν και τα ισοένζυμά του.^[97]

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-1 (GPX-1) ή κυτοσολική υπεροξειδάση είναι ένα ομοτετραμερές που περιέχει μία σεληνοκυστεΐνη σε κάθε υπομονάδα. Η βιοσύνθεση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι παρόμοια με το σύνολο των σεληνοπρωτεϊνών και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του σεληνίου (Se). Είναι άφθονη σε ανθρώπινους ιστούς με υψηλή υπεροξειδική παραγωγή, σε ιστούς όπως τα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς, το ήπαρ και τους πνεύμονες και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση από το H_2O_2 , προστατεύει από την κυτταροτοξική-επαγόμενη από τα υπεροξείδια οξειδωτική βλάβη, την υπεροξείδωση λιποειδών και την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, ενώ αυξημένη δραστηριότητα της GPX αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από τα υδροϋπεροξείδια.^[98]

Σήμερα οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης αναφέρονται μαζί με τη γλουταθειόνη ως οι κύριοι αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον 7 τύποι του ισοενζύμου GPXS και το καθένα έχει διαφορετικές ιδιότητες και βρίσκεται σε άλλο σημείο στο σώμα. Όπως αναφέρθηκε η GPX-1 θεωρείται ως το κύριο ένζυμο για την απομάκρυνση του H_2O_2 . Τα επίπεδα της GPX-1 φαίνεται να επηρεάζονται κατά πολύ από τις διακυμάνσεις των επιπέδων σεληνίου, σε σχέση με άλλες σεληνοπρωτεΐνες. Η GPX-2 βρίσκεται στο κυταρόπλασμα και είναι σημαντική στο επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα (από τον οισοφάγο στο παχύ έντερο). Η GPX-3 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος και αντιτίθεται σε οποιαδήποτε υδροϋπεροξειδική μεταφορά. Η GPX-4 είναι ένα μονομερές, βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στις μεμβράνες και αντιδρά με υδροϋπεροξείδια φωσφολιποειδών και χοληστερόλη της κυτταρικής μεμβράνης. Η GPX-5 περιέχει κυστεΐνη και περιέχεται στην επιδιδυμίδα και σε μικρή ποσότητα στο ανθρώπινο σπέρμα ως εκκριτική πρωτεΐνη. Η GPX-6 ανευρίσκεται στο οσφρητικό επιθήλιο, σε έμβρυα και ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη, με άγνωστη μέχρι τώρα δράση.^[98]

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι ικανές να επιφέρουν μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων οξειδώνοντας τη γλουταθειόνη (GSH), η οποία δρα ως αναγωγικό μέσο. Εμπλέκονται στη προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη ως υπόστρωμα. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη που προκύπτει από τη μεταφορά των ηλεκτρονίων της στο υπεροξείδιο, μετατρέπεται σε πλήρως ενεργό τριπεπτίδιο με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), η οποία απαιτεί μείωση των ισοδυνάμων από το NADPH.^[98-99]

Οξειδωτικό στρες - Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX-1) - Καρκίνος

Αν και η οξείδωση είναι η πιο κοινή βιολογική αντίδραση και παράλληλα πηγή ενέργειας, το οξειδωτικό στρες είναι επιβλαβές για τα κύτταρα, επειδή τα προϊόντα της οξείδωσης, όπως οι ελεύθερες ρίζες και τα υπεροξείδια μπορούν να βλάψουν συστατικά του κυττάρου, προκαλώντας διάφορες ασθένειες. Το οξυγόνο είναι ιδιαίτερα δραστικό και επιβλαβές μόριο για τους ζωντανούς οργανισμούς, με την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), υπο-χλωριώδες οξύ (HOCL) και τις ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$), το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) και υπεροξείδια λιπιδίων. Άμεσα ή έμμεσα, αυτά τα χημικά είδη οξυγόνου μπορεί να προκαλέσουν παροδική ή μόνιμη βλάβη σε νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, και πρωτεΐνες.^[100-101]

Το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση λόγω της επαγωγής της βλάβης του DNA και των επιπτώσεων του στα μονοπάτια της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) επάγουν σχεδόν όλες οι μορφές της βλάβης του DNA, όπως τροποποιήσεις των βάσεων, θραύση κλώνου και σύνδεσης DNA-πρωτεΐνης. ROS μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου με την επαγωγή και τη διατήρηση των ογκογόνων φαινότυπων των καρκίνων.^[100]

Για την προστασία του, το σώμα διατηρεί πολύπλοκα συστήματα πολλαπλών τύπων αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνη C και βιταμίνη E, καθώς και ένζυμα όπως η καταλάση (CAT), δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και η γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST). Αυτά τα συστατικά ή ένζυμα εμπλέκονται σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις για την πρόληψη της επιβλαβούς οξειδωτικής βλάβης. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ακριβώς για να ερευνηθεί η ικανότητά της στον καθαρισμό των ελεύθερων ριζών στα καρκινικά κύτταρα PC3.^[100]

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και καρκίνος

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης όπως και η αναγωγάση της γλουταθειόνης δρούν αντιοξειδωτικά. Η GPX καταλύει την χημική αποτοξίνωση του οργανισμού από το H_2O_2 μέσω της οξείδωσης της γλουταθειόνης σε GSSG και στη συνέχεια η αναγωγάση της γλουταθειόνης αναγεννά την γλουταθειόνη από τη μορφή GSSG χρησιμοποιώντας τον αναγωγικό παράγοντα NADPH.

Απώλεια της δράσης της GPX-1 μπορεί να συμβάλει στην έναρξη της καρκινογένεσης, και, σε μεταγενέστερα στάδια του καρκίνου, η ανεπάρκεια GPX-1 μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό. Αντίθετα, περίσσεια GPX-1 μπορεί να αποτρέψει την οξειδωτική βλάβη (όπως DNA-οξείδωση) και φλεγμονή, αλλά μπορεί επίσης να εμποδίσει

αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων, με αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η GPX-1 έχει σύνθετη επίδραση στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου και οφείλεται, εν μέρει, στο ρόλο της ρύθμισης ενδοκυτταρικών ROS. Έχει προταθεί ότι η μειωμένη έκφραση της GPX-1 μπορεί επηρεάσει την ανάπτυξη του καρκίνου, ενώ η έκφραση της καταστέλλεται σε κάποιες μορφές καρκίνου.^[102] Αρκετές μελέτες σχετίζονται με τη σύνδεση της δυσλειτουργικής GPX και τον κίνδυνο καρκίνου. Απώλεια ετεροζυγωτίας κυτοσολικής γονιδίου GPX-1 έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.^[103] Σε καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου έχει ανακαλυφθεί μία νέα αντι-οξειδωτική προστατευτική λειτουργία του TGF-β1, η οποία έχει προκύψει μέσω της επαγωγής της έκφρασης της GPX-1 και της ενζυμικής δραστηρότητάς της, που οδηγεί σε προστασία των καρκινικών κυττάρων από το θάνατο που προκαλείται από εξωγενή H₂O₂.^[104]

Τι συμβαίνει στον καρκίνο του προστάτη

Τα στοιχεία από επιδημιολογικές, πειραματικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη που εκτίθενται σε αυξημένο οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένο οξειδωτικό στρες στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη σε σύγκριση με μάρτυρες χωρίς κακοήγη ασθένεια ή με καλοήγη υπερπλασία του προστάτη ίδιας ηλικίας. Επιπλέον παρουσιάστηκαν χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (SOD, GPX, CAT).^[105-106]

NO – ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO·) αποτελεί ένα μικρό μόριο, το οποίο περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Συντίθεται κατά την οξείδωση της L-αργινίνης προς κιτρουλίνη, με μια διεργασία που καταλύεται από τις συνθετάσες του NO (NOSs). Το NO αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών, όπως η νευρομεταβίβαση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η χάλαση των λείων μυϊκών ινών, η ανοσία. Μπορεί να μετατραπεί σε πολλές άλλες δραστικές ρίζες αζώτου, όπως NO⁺, NO⁻ και υπεροξυ νιτρώδες (ONOO⁻). Το ONOO⁻ παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το ανιόν υπεροξειδίου.^[107]

Πέμπτο μέρος : Αυτοφαγία

Αυτοφαγία

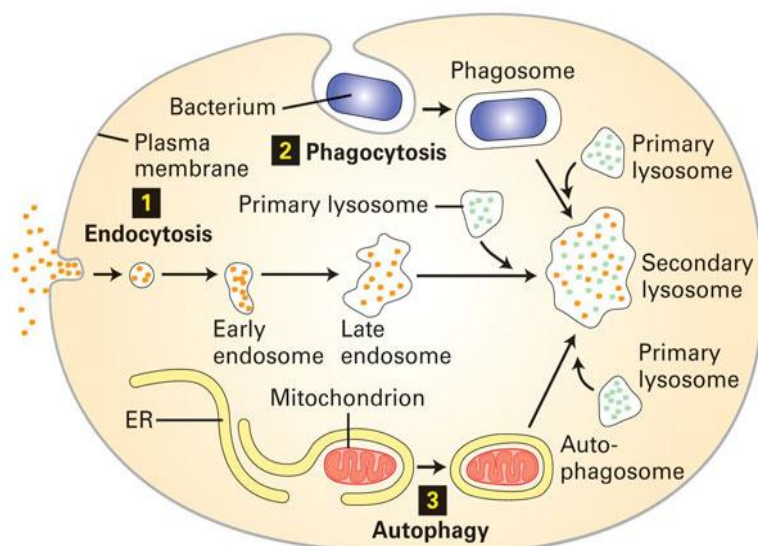
Αυτοφαγία είναι μια καταβολική διαδικασία με σημαντική λειτουργία στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και στη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων κάτω από συνθήκες στρες.^[108] Η αυτοφαγία είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει την αποικοδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων και κυτταροπλασματικών συστατικών από τα λυσοσώματα. Υπάρχουν τρεις κύριες μορφές αυτοφαγίας, η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και συνοδό-μεσολαβούμενη

αυτοφαγία (Chaperone Mediated Autophagy CMA), οι οποίες χαρακτηρίζονται από διάφορους μηχανισμούς παροχής φορτίων προς το λυσόσωμα. Η μακροαυτοφαγία πολλές φορές αναφέρεται απλά ως αυτοφαγία γιατί είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη και μελετημένη αυτοφαγική διαδικασία. Η αυτοφαγία χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό κυστιδίων με διπλή μεμβράνη^[109], τα αυτοφαγοσώματα, που δεσμεύουν το φορτίο που προορίζεται για την αποικοδόμηση στο λυσόσωμα, με σκοπό την ανακύκλωση ενέργειας και δομικών στοιχείων για τη σύνθεση νέων βιομορίων. Η αυτοφαγία είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε όλους τους οργανισμούς και σε όλα τα είδη κυττάρων που έχουν μέχρι σήμερα εξεταστεί. Σε κανονικές συνθήκες με επαρκή θρεπτικά συστατικά η αυτοφαγία διεξάγεται σε ένα βασικό ρυθμό και λειτουργεί ως ένας μηχανισμός «ποιοτικού ελέγχου»: απομακρύνει ελαττωματικές ή μακρόβιες πρωτεΐνες, κατεστραμμένα οργανίδια ως μέσο ανακύκλωσης των περιεχομένων κυττάρων αλλά και της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης και ακεραιότητας και γενικά συστατικά που μπορεί να είναι επιβλαβή για το κύτταρο. Το επίπεδο της δραστηριότητας της αυτοφαγίας, μπορεί, ωστόσο, να διαμορφώνεται από την απόκριση σε μια ποικιλία ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών συνθημάτων, όπως αυτά που συναντώνται σε καταστάσεις ασθένειας, συμπεριλαμβανομένης της αστίας, υποξίας και άλλες μορφές μεταβολικού στρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συστατικά από την πέψη του κυτταροπλάσματος ανακυκλώνονται μέσω βιοσυνθετικών οδών. Ωστόσο, κάτω από συνθήκες μεταβολικού στρες, τα προϊόντα της αυτοφαγίας μπορεί να καταβολίζονται περαιτέρω για να τροφοδοτήσουν τη σύνθεση ATP.^[109] Η αυτοφαγία μπορεί να είναι μη-επιλεκτική και να πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, ή επιλεκτική, περιλαμβάνοντας την στοχευμένη αποικοδόμηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή και οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια (mitophagy), ριβοσώματα (ribophagy) ή λιπίδια (lipophagy).

Στάδια της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία είναι μια πορεία καταβολισμού που λαμβάνει χώρα σε οργανισμούς από τις ζύμες έως τα ανώτερα θηλαστικά. Η αυτοφαγική διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί σε διάφορα διακριτά βήματα: σηματοδότηση και επαγωγή, δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων πυρήνων, επέκταση μεμβράνης και ολοκλήρωση κυστιδίου, αυτοφαγόσωμα, σύνδεση και σύντηξη με το λυσόσωμα και τέλος, αποικοδόμηση και επανεξαγωγή των υλικών στο κυτταρόπλασμα. Βασικός παράγοντας που πυροδοτεί την έναρξή της είναι η έλλειψη διατροφικών στοιχείων απαραίτητων για τη ανάπτυξη του κυττάρου. Τα κυτταροπλασματικά συστατικά απομονώνονται με τη βοήθεια μιας μοναδικής μεμβρανικής δομής που καλείται φαγοφώρο ή μεμβράνη απομόνωσης (PAS). Όταν έχει ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία σχηματίζεται μια κυκλική δομή, το αυτοφαγόσωμα, στο εσωτερικό του οποίου βρίσκονται τα διάφορα συστατικά και οργανίδια περικλειόμενα από διπλή μεμβράνη. Ακολούθως πραγματοποιείται σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα προς σχηματισμό του αυτοφαγολυσοσώματος ή αυτολυσοσώματος και αποικοδόμηση του περιεχομένου του με τη δράση των λυσοσωμικών υδρολασών. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα, απελευθερώνονται εκ νέου στο κυτταρόπλασμα με σκοπό την επαναχρησιμοποίησή τους από το κύτταρο για την κάλυψη των αναγκών του. Στην διπλοειδή μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος, η σύσταση της εξωτερικής μεμβράνης είναι διαφορετική από τη σύσταση της εσωτερικής. Η LC3 πρωτεΐνη εντοπίζεται στην

εσωτερική μεμβράνη και λειτουργεί ως υποδοχέας του υποστρώματος p62/SQSTM1 το οποίο εμπλέκεται σε πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών. Γι'αυτό το λόγο σε πολλές δοκιμασίες ανιχνεύεται η LC3 πρωτεΐνης ως δείκτη ύπαρξης αυτοφαγικής δραστηριότητας στο κύτταρο.^[110]



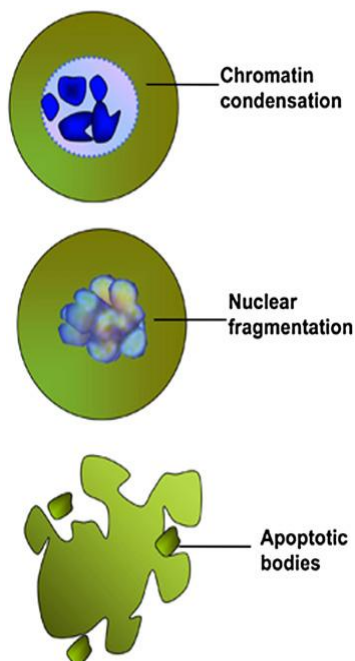
Assays for Apoptosis and Autophagy—Section 15.5

<http://www.invitrogen.com>

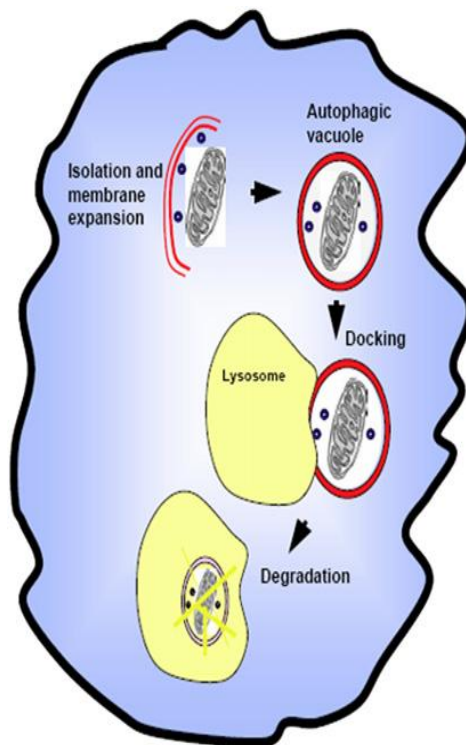
Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Η αυτοφαγία εμπλέκεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση, είναι ο τύπου I προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και χαρακτηρίζεται από τη συμπύκνωση της χρωματίνης και του κυτταροπλάσματος, κατάτμηση DNA και κυτταρικό κατακερματισμό των αποπτωτικών σωμάτων, που ακολουθείται από απομάκρυνση των κυττάρων που πεθαίνουν με φαγοκυττάρωση. Ο τύπου II προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος – αυτοφαγία - χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση αυτοφαγικών κυστιδίων (αυτοφαγοςώματα και αυτοφαγολυσοσώματα) και συχνά παρατηρείται όταν απαιτείται μαζική απομάκρυνση κυττάρων ή όταν τα φαγοκύτταρα δεν έχουν εύκολη πρόσβαση στα νεκρά κύτταρα. Ένα χαρακτηριστικό που διακρίνει την απόπτωση από τον αυτοφαγικό θάνατο του κυττάρου είναι η πηγή των λυσοσωματικών ενζύμων που χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση των περισσότερων κυττάρων. Τα αποπτωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν φαγοκυτταρικά λυσοσώματα για τη διαδικασία αυτή, ενώ τα κύτταρα αυτοφαγίας χρησιμοποιούν κύτταρα με ενδογενή λυσοσωματικό μηχανισμό. Δεν έχει γίνει σαφές αν η αυτοφαγία προκαλεί άμεσα κυτταρικό θάνατο ή αν είναι δευτερεύον φαινόμενο της απόπτωσης. Μια πρόσφατη μελέτη, ωστόσο, δείχνει ότι η η αυτοφαγία θα μπορούσε να προκαλέσει θάνατο των κυττάρων. Ο αναστολέας της κασπάσης που επάγει τον κυτταρικό θάνατο με αυτοφαγία επηρεάζεται πολύ από την παρέμβαση RNA (RNAi) με την έκφραση ATG7 και beclin 1, δύο γονίδια τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την αυτοφαγία.^[111]

Απόπτωση



Αυτοφαγία



Ελαττωματική αυτοφαγική διαδικασία είναι συνδεδεμένη με ασθένειες όπως η ηπατική βλάβη, ο νευροεκφυλισμός, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η γήρανση και ο καρκίνος. Ο ρόλος της αυτοφαγίας στην ογκογένεση είναι σύνθετος και εξαρτάται από την κατάσταση.^[108]

Αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα

Η σύνδεση μεταξύ αυτοφαγίας και μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων είναι ένα θέμα μεγάλου ενδιαφέροντος και με κλινική σημασία, αφού τα μεταβολικώς στρεσαρισμένα καρκινικά κύτταρα στηρίζονται στην αυτοφαγία για την επιβίωση και τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού τους και για τη διευκόλυνση της ταχείας κυτταρικής τους ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους.^[109]

Η σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και καρκίνου είναι περίπλοκη και αμφιλεγόμενη δεδομένου του γεγονότος ότι κάθε στάδιο της αυτοφαγικής πορείας διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στην δημιουργία και στην εξέλιξη ενός όγκου. Η αυτοφαγία είναι παράγοντας τόσο για την προαγωγή όσο και για την πρόληψη του καρκίνου και ο ρόλος της μπορεί να τροποποιηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου. Η αναστολή της αυτοφαγίας μπορεί να επιτρέψει τη συνεχή ανάπτυξη των προκαρκινικών κυττάρων και έτσι η αυτοφαγία να μπορεί να λειτουργήσει ως καταστολέας του καρκίνου. Εν

συνεχεία, όσο ο όγκος μεγαλώνει, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να χρειαστεί να χρησιμοποιήσουν την αυτοφαγία για να επιβιώσουν σε συνθήκες με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, ιδίως στην εσωτερική περιοχή του όγκου που υπάρχουν ελάχιστα αγγεία. Επιπλέον, η αυτοφαγία μπορεί να προστατεύσει ορισμένα καρκινικά κύτταρα από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες, ενδεχομένως με απομάκρυνση κατεστραμμένων μακρομορίων ή οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια, το οποίο τα προστατεύει από την απόπτωση και επιτρέπει τη συνεχή επιβίωση των μετασχηματισμένων κυττάρων. ^[111] Απώλεια αυτοφαγίας μπορεί να αυξήσει την τάση των κυττάρων προς ογκογόνο μετασχηματισμό, όπως και τα αυτοφαγικώς ελαττωματικά κύτταρα είναι συχνά πιο καρκινογόνα από άγριου τύπου ομολογά τους σε συνδυασμό με βλάβες στη συσσώρευση του DNA, γονιδιωματική αστάθεια και επίμονη φλεγμονή. Την ίδια στιγμή, η αυτοφαγία είναι ένα σημαντικός μηχανισμός κυτταρικής επιβίωσης, ως μια καταβολική διαδικασία κρίσιμη για την παραγωγή ATP και ανακύκλωση αμινοξέων. Αυτή η λειτουργία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν υψηλές απαιτήσεις μεταβολισμού και απαιτήσεις για επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού. ^[109]

LC3 πρωτεΐνη

Η LC3 πρωτεΐνη εντοπίζεται στην μεμβράνη των αυτοφαγοσωμάτων κατά το σχηματισμό τους. Πρόκειται για μια συνδεδεμένη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη ελαφριάς αλυσίδας με μοριακό βάρος περίπου 17kDa. Βρίσκεται σε τέσσερις ισομορφές LC3A, LC3B, LC3C, LC3D με την LC3B να είναι η συνηθέστερη. Αμέσως μετά την σύνθεση της, η LC3 υφίσταται κατεργασία στο καρβοξυτελικό της άκρο από την Atg4 και μετά την αφαίρεση 22 αμινοξέων, σχηματίζεται η LC3-I η οποία και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στην συνέχεια, η LC3-I ενώνεται με την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σχηματίζεται η LC3-II, που βρίσκεται και στην εξωτερική και στην εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος. Κατά τον ακόλουθο σχηματισμό των αυτολυσωσωμάτων και την αποικοδόμηση του περιεχομένου τους, η LC3-II της εσωτερικής μεμβράνης αποικοδομείται στον λυσοσωμικό αυλό από λυσοσωματικά ένζυμα ενώ η LC3 στην εξωτερική μεμβράνη αποκόπτεται από την Atg4 με αποτέλεσμα την πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε ολική LC3.

Η λυσοσωμική μετατροπή του αυτοφαγοσωμικού δείκτη LC3-II αποτελεί ένδειξη της επαγόμενης-στερούμενης θρεπτικών συστατικών-αυτοφαγίας. Επομένως η ανίχνευση της LC3 με ανοσοαποτύπωση ή ανοσοφθορισμό, αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο παρακολούθησης της αυτοφαγίας και των μηχανισμών που σχετίζονται με αυτήν, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού θανάτου.

B. ΣΚΟΠΟΣ

- Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων κρασιού και κολοκυθόσπορου σε καρκινικά κύτταρα προστάτη της σειράς PC-3 όσον αφορά στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες των κυττάρων.
- Να μελετηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων κρασιού και κολοκυθόσπορου στο μηχανισμό αυτοφαγίας των προστατικών καρκινικών κυττάρων PC-3.

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Απομόνωση και διαχωρισμός εκχυλισμάτων

Εκχυλίσματα κρασιού : Τα εκχυλίσματα του κρασιού προέρχονται από ερυθρό και λευκό οίνο του κτήματος Χατζημιχάλη. Συγκεκριμένα από ερυθρό ξηρό οίνο της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (Cabernet Sauvignon του 2003, 750ml, 13,5%vol) και από λευκό ξηρό οίνο της ποικιλίας Ρομπόλα (Ambelon του 2005, 750ml, 12% vol) και γνωστής περιεκτικότητας σε ολικά και ορθο-φαινολικά, καθώς και σε γλυκο- και φωσφο-λιποειδή. Ακολούθησε απομόνωση και διαχωρισμός των λιποειδών από τα κρασιά.

Εκχύλισμα Κολοκυθόσπορου: Χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμος κολοκυθόσπορος (Vamnalis Foods SA), καβουρδισμένος και αλατισμένος, με προέλευση από Βουλγαρία. Οι σπόροι επιλέχθηκαν με το χέρι για την απομάκρυνση εκείνων που είχαν ρωγμές ή άλλες φθορές. Ακολούθησε απομόνωση και διαχωρισμός των εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου με βάση τα πολικά και ουδέτερα λιποειδή.

Κυτταρική Σειρά Καρκίνου Προστάτη PC-3

Η κυτταρική σειρά PC-3 προέρχεται από οστική μετάσταση ανθρώπινου προστατικού αδενοκαρκινώματος και χαρακτηρίζεται ως ανδρογono-ανεξάρτητη κυτταρική σειρά, αφού δεν απαντά στα ανδρογόνα. Πρόκειται για μια ευρέως χρησιμοποιούμενη σειρά για την *in vitro* μελέτη του καρκίνου του προστάτη. Αυτό γιατί τα κύτταρα PC-3 παρουσιάζουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης, δεν εκφράζουν το γονίδιο p-53 που συρρικνώνει τους όγκους, έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο K-ras που είναι απαραίτητο για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς και τέλος έχουν διαρκώς ενεργοποιημένο το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K)/Akt που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη.

Κυτταροκαλλιέργειες

Τα κύτταρα PC-3 (American Type Cell Culture ATCC) καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών επιφάνειας 75m². Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν Dulbecco's modified Eagle's medium F/12 HEPES (DMEM/F12) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη 2mM, στρεπτομυκίνη 100μg/ml, πενικιλίνη 100U/ml καθώς και εμβρυϊκό βόειο ορό 5% (FBS). Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο κυτταροκαλλιιεργειας στους 37°C και σε 5% CO₂. Κάθε 2 ημέρες γίνονταν αλλαγή του θρεπτικού μέσου και ανακαλλιιεργεια των ζωντανών κυττάρων σε αναλογία 1/3.

Αντιδραστήρια και όργανα

- Καλλιεργητικό υλικό DMEM
- Βόειος εμβρυϊκός ορός (FBS)
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7.4)
- Θρυψίνη
- Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-υλο)-2,5 διφαινυλοβρωμιούχο tetrazolium]
- Καλλιεργητικές φλάσκες
- Αποστειρωμένα tips
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15 και 50ml
- Αιθανόλη
- Αποστειρωμένα errendorfs και αυτόματες πιπέτες
- Επωαστικός θάλαμος διοξειδίου (37°C, 5% CO₂)
- Θάλαμος νηματικής ροής (LAMINAR) με λάμπες UV.

Συλλογή και επεξεργασία κυττάρων για τον προσδιορισμό οξειδωτικού στρες

Σε φλάσκες PC-3 των 75cm² έχει γίνει επίδραση με 15μg/ml ρεσβερατρώλη, 150 μg/ml FIIC (κόκκινο κρασί), 150 μg/ml FIIA (λευκό κρασί) , 150 μg/ml KPL (εκχύλισμα κολοκυθόσπορου με πολικά λιποειδή) και 200 KW μg/ml (εκχύλισμα κολοκυθόσπορου σε υδατική φάση). Μετά την αναρρόφηση του υπερκείμενου και την προσθήκη 1 ml PBS, κρατάμε 25μl σε errendorf και προστίθενται και 25 μl NaOH για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης. Έπειτα κάνουμε φυγοκέντρηση στα 500g για 10 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 143μl PBS με pH 8 και 17μl TCA 40%. Αναδεύουμε και αφήνουμε τα errendorf για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί sonication για 5 δευτερόλεπτα (2* 10% και έντασης 30%). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500g για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) και τέλος, παραλαμβάνονται 150μl (υπερκείμενο) που αποθηκεύονται στους -80°C.

A. Προσδιορισμός νιτρωδών στα υπερκείμενα των δειγμάτων

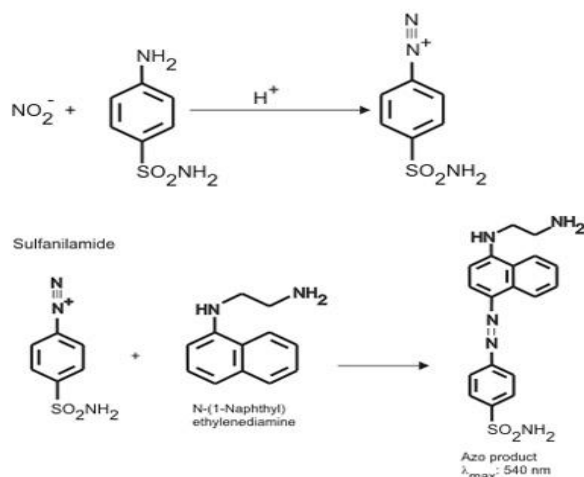
Μέθοδος με το αντιδραστήριο Griess

Αρχή της μεθόδου

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα σημαντικό δραστικό μόριο και μεταφορέας σε πολλά βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων του ανοσοποιητικού και

καρδιαγγειακού συστήματος. Λόγω του ότι συμμετέχει σε διάφορα συστήματα υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον στη μέτρηση NO σε διάφορους ιστούς και υγρά. Ένα μέσο για να διερευνηθεί η παραγωγή νιτρικού οξειδίου είναι η μέτρηση των νιτρώδων (NO_2) το οποίο είναι ένα από τα κύρια και πιο σταθερά προϊόντα διάσπασης του NO.

Αυτή η διαδικασία βασίζεται σε μια διαδικασία διαζώτωσης που περιγράφηκε πρώτα από τον Griess το 1879. Το σύστημα αντιδραστηρίων Griess βασίζεται στην παρακάτω χημική αντίδραση :



Αντιδραστήρια/όργανα:

- **Αντιδραστήριο Griess :**

Περιέχει → 50ml διάλυμα σουλφανιλαμίδιο

50ml NED (N-1-Napthylethylenediamine dihydrochloride)

1ml πρότυπο νιτρώδη (0,1M νιτρώδες νάτριο)

Συνθήκες αποθήκευσης → Στο ψυγείο, φυλάσσεται στους 4°C , προστατευόμενο από το φως.

- Αυτόματες πιπέτες και πολυκάναλη πιπέτα
- Δεξαμενές αντιδραστηρίων
- **Δείγματα (100μl υπερκείμενο από Control, Resveratrol, FIIC, FIIA , KPL, KW)**
- Πλάκα 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα ενζυματικής ανίχνευσης
- Αναγνώστης πλάκας με φίλτρο 520-550nm (πρόγραμμα BIOTEK GEN5)

Αναλυτική Πορεία :

α) Παρασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς NaNO_2 .

Αρχικά ετοιμάσαμε ένα διάλυμα νιτρώδους με αραιώση 0,01mM. Κατανέμουμε το θρεπτικό υλικό (DMEM) στα πηγαδάκια από 1-8, ακολούθως προσθέτουμε το

αραιωμένο διάλυμα NO_2 και τέλος το αντιδραστήριο Griess. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά και ακολούθως μετράμε την απορρόφηση στα 540nm, στο BIOTEK Elisa reader.

	1 ^ο στάδιο	2 ^ο στάδιο	3 ^ο στάδιο
	DMEM + SERUM	NO_2	Griess
1	100μl (τυφλό)	0μl	100μl
2	97,5	2,5	100
3	95	5	100
4	90	10	100
5	85	15	100
6	80	20	100
7	40	60	100
8	20	80	100
Επώαση 5 min - Απορρόφηση στα 540nm			

β) Προσδιορισμός NaNO_2 στα δείγματα

Προσθέτουμε 100μl από το κάθε δείγμα. Ακολουθώντας προσθέτουμε 100μl αντιδραστήριο Griess, πραγματοποιούμε επώαση στο σκοτάδι για 5 λεπτά και στη συνέχεια μετράμε την απορρόφηση.^[112-113]

		1 ^ο στάδιο	2 ^ο στάδιο
	ΔΕΙΓΜΑΤΑ		Griess
1	Control	100μl	100μl
2	Resveratrol	100	100
3	FIIC	100	100
4	FIIA	100	100
5	KPL	100	100
6	KW	100	100
Επώαση για 5min – Απορρόφηση στα 540nm			

Β) Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) στα υπερκείμενα των δειγμάτων

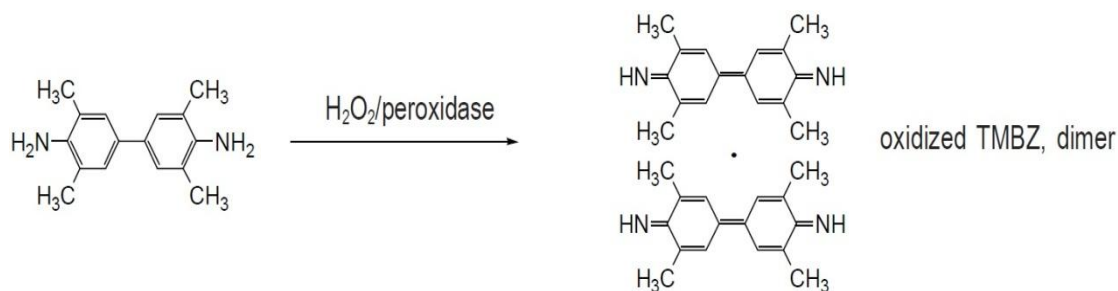
Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα μιας υπεροξειδάσης να αντιδράει με το

υπεροξειδίου του υδρογόνου, μετά από τη μετατροπή του TMB (τετρα – μεθυλο – βενζιλιδίνη), σε έγχρωμο προϊόν με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό των υπεροξειδίων. Ύστερα από προσθήκη τερματικής ουσίας (θειικό οξύ) τα δείγματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 450nm.

Η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω της επί τοις εκατόν διαφοράς της περιεκτικότητας H_2O_2 των εκχυλισμάτων σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (CONTROL).

Χημική αντίδραση :



Αντιδραστήρια/όργανα :

- Υπεροξειδάση : συντήρηση στους $-20^{\circ}C$ και αναδιάλυση με απιονισμένο νερό. Αραίωση 1/10 (100μl υπεροξειδάσης με 900μl νερό)
- TMB (2, 2', 5, 5 τετρα – μεθυλο - βενζιλιδίνη) συντήρηση στο ψυγείο.
- H_2SO_4 2N συντήρηση σε θερμοκρασία δωματίου
- Αυτόματες πιπέτες και πολυκάναλη πιπέτα
- Πλάκα 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα ενζυματικής ανίχνευσης
- Αναγνώστης πλάκας με φίλτρο 450nm (BIOTEK GEN5, Elisa reader)

Προετοιμασία δειγμάτων

- 50μl H_2O
- 50μl 0,01% υπεροξειδάση
- 50μl υπόστρωμα TMB
- 50μl υπερκείμενο μετά από 24ωρη επώαση (**Control, Resveratrol, FIIC, FIIA, KPL, KW**)

Αναλυτική Πορεία :

- Προσθέτουμε με την ακόλουθη σειρά χρησιμοποιώντας αυτόματες πιπέτες τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε πλάκα 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα ενζυματικής ανίχνευσης.
- Αναγνώστης πλάκας με φίλτρο 450nm (πρόγραμμα BIOTEK GEN5).

Αντίδραση

	Νερό (μl)	DMEM (μl)	Δείγμα	TMB (μl)	Peroxidase (μl)
Τυφλό (blank)	50	50	-	50	50
Control	50	-	50	50	50
Resveratrol	50	-	50	50	50
FIIC	50	-	50	50	50
FIIA	50	-	50	50	50
KPL	50	-	50	50	50
KW	50	-	50	50	50
Παραμονή 10min στο σκοτάδι					
H ₂ SO ₄ 2N 50μl σε όλα					
Απορρόφηση στα 450nm					

Συλλογή κυττάρων για προσδιορισμό υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) .

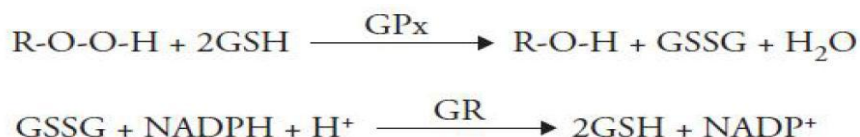
Από φλάσκα 75cm² (control), γίνεται μεταφορά του υπερκειμένου της φλάσκας σε tube. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 500g για 10 λεπτά, όπου παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε 3 erpendorf. Ακολουθεί το ξέπλυμα της φλάσκας με 2 ml παγωμένο PBS και απόχυσή του. Ακολουθεί προσθήκη 3 ml παγωμένου PBS και απόξεση των κυττάρων με scraper. Μεταφορά των κυττάρων σε tube, φυγοκέντρηση στα 1000g για 10 λεπτά και προσθήκη 320μl διαλύματος Tris-HCl (50mM), EDTA (5mM) DTT (1mM). Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 500g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Τέλος, παραλαβή του υπερκειμένου και φύλαξη στους -80°C.

Προσδιορισμός δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Αρχή της μεθόδου

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων, συμπεριλαμβανομένων και των υπεροξειδίων του υδρογόνου, με τη βοήθεια της ανηγμένης γλουταθειόνης και έτσι λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στην οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων. Το ένζυμο χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη ως μοναδικό δότη ηλεκτρονίων προκειμένου να αναγεννηθεί η ανηγμένη μορφή της σελινοκυστεΐνης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) μετρήθηκε έμμεσα μέσω μιας συζευγμένης αντίδρασης με την αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR). Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), που παράγεται ύστερα από αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων από την GPx, μετατρέπεται ξανά στην ανηγμένη της μορφή από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και το NADPH, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σχήμα Αντίδραση αναγωγής υδροϋπεροξειδίων και αναγέννησης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη, NADPH: β- νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο, ανηγμένη μορφή, NADP+: β- νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο, οξειδωμένη μορφή)

Η οξείδωση του NADPH σε NADP+ συνοδεύεται από μία μείωση στην απορρόφηση στα 340nm. Υπό συνθήκες όπου η δραστηριότητα της GPx μειώνεται, ο ρυθμός της μείωσης της απορρόφησης στα 340nm είναι ανάλογος της δραστηριότητας της GPx στο δείγμα.

Όργανα : ELISA reader

Αντιδραστήρια/Διαλύματα

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Sodium Phosphate Buffer, PBS) 50 mM με EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,4mM, pH 7.0 (PBS/EDTA)
- PBS 50 mM/EDTA 0,4mM pH 7,0 που περιέχει αζίδιο του νατρίου (NaN₃) 1mM. (PBS/Sodium azide)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM με διθειοθρεϊτόλη (DTT) 1mM, pH 7,0. (PBS/DTT)
- Διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης 100 U/mL. (GR): Αραίωση stock διαλύματος αναγωγάσης με παγωμένο αποσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το πείραμα.
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200mM. (GSH) σε απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα H₂O₂ 0,042% σε απεσταγμένο νερό
- β-NADPH: β-νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο σε ανηγμένη μορφή

Αναλυτική πορεία

Κατά τη εκτέλεση του πειράματος ακολουθήθηκαν αναλυτικά τα παρακάτω βήματα:

- Λίγο πριν το πείραμα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).
- Το μίγμα αντίδρασης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
PBS/Sodium azide	9100 μ L
GR	100 μ L
GSH	50 μ L
NADPH	1mg

Αναδιαλύεται το NADPH με ήπια ανακίνηση και ρυθμίζεται το pH εφόσον είναι αναγκαίο στο 7,0. Το διάλυμα διατηρείται στους 25° C.

- Εισάγονται τα παρακάτω διαλύματα σε πηγαδάκια μικροπλακιδίων και διεξάγεται το πείραμα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Δείγμα
Μίγμα αντίδρασης	200 μ L	200 μ L
Διαλύτης διαλύματος GPX	50 μ L	-
Διάλυμα GPX	-	50 μ L
Ανάμιξη με το tip και παραμονή 1 λεπτό σε Θδωμ.		
Διάλυμα H ₂ O ₂	5 μ L	5 μ L
Μέτρηση A στα 340nm για 6min ανά 1min (30°C)		

Υπολογισμός Δραστικότητας

Ο υπολογισμός της δραστικότητας έγινε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Units/mL παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A/\text{min, sample} - \Delta A/\text{min, blank}) \times 2 \times 0,255 \times df}{5,60 \times 0,05}$$

όπου:

2: Τα μ moles της GSH που παράγονται για κάθε μ mole NADPH που οξειδώνεται.

0,255: Ο τελικός όγκος σε mL.

df: Ο συντελεστής αραιώσης αν το δείγμα της GPx αραιωθεί.

5,60: Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9 cm).

0,05: Ο όγκος του διαλύματος της GPx που χρησιμοποιείται στο προσδιορισμό

Ορισμός Unit: Ένα unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την οξείδωση από το H₂O₂ 1,0 μ mole ανηγμένης γλουταθειόνης σε οξειδωμένη γλουταθειόνη ανά λεπτό σε pH=7,0 στους 25° C.

ΠΗΓΗ : Wendel, A. *Enzymatic Basis of Detoxication*, Academic Press NY1980; 1:333.

Προσδιορισμός Πρωτεΐνης (Bradford assay)

Αντιδραστήρια και όργανα

- Φασματοφωτόμετρο

- Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 πηγαδιών (plate)
- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) συγκέντρωσης 100μg/ml
- διάλυμα εργασίας Bradford: αραιώση του διαλύματος BSA ¼ με αποσταγμένο νερό

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την γρήγορη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. Βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος του αντιδραστηρίου, όταν δεσμεύεται με πρωτεΐνες. Όταν δεσμευτεί, υπάρχει μια άμεση αλλαγή της μέγιστης απορρόφησης από 465 σε 595nm με μία ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος σε μπλε.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά ετοιμάζουμε την πρότυπη καμπύλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αραιώση στα δείγματα 2/160 με αποσταγμένο νερό και προστίθενται στα πηγάδια. Τα πρότυπα και τα δείγματα προστίθενται εις διπλούν. Η αντίδραση ξεκινάει με την ταυτόχρονη προσθήκη 50μl διαλύματος εργασίας Bradford. Αφού γίνει ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται το plate για φωτομέτρηση στα 595nm.

Ανοσοφθορισμός - Αυτοφαγία

Ανοσοφθορισμός (immunofluorescence)

Αρχή μεθόδου

Η ανάλυση ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε με στόχο τον εντοπισμό της LC3 πρωτεΐνης στα PC-3 κύτταρα. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία. Καθώς η πρωτεΐνη LC3 σχετίζεται με την αυτοφαγία, η ανίχνευσή της είναι σημαντική για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης των παραγόντων που χορηγήθηκαν στα κύτταρα.

Με βάση τη βιβλιογραφία, η μετακίνηση της πρωτεΐνης LC3 από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα, που έχει ως αποτέλεσμα την **περιπυρηνική της εμφάνιση**, είναι δείκτης αυτοφαγίας. Ο ανοσοφθορισμός στηρίζεται στο γεγονός της ειδικότητας των αντισωμάτων απέναντι στο αντιγόνο τους. Έτσι, φθορίζουσες χρωστικές στοχεύουν σε συγκεκριμένους βιομοριακούς στόχους μέσα σε ένα κύτταρο, και ως εκ τούτου επιτρέπουν την απεικόνιση της κατανομής του μορίου στόχου μέσα στο δείγμα.

Αναλυτική πορεία

Τα κύτταρα PC-3 (20.000 cells/well) καλλιεργήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες (Lab-Tek Nalge-Nunc, Napierville, IL).

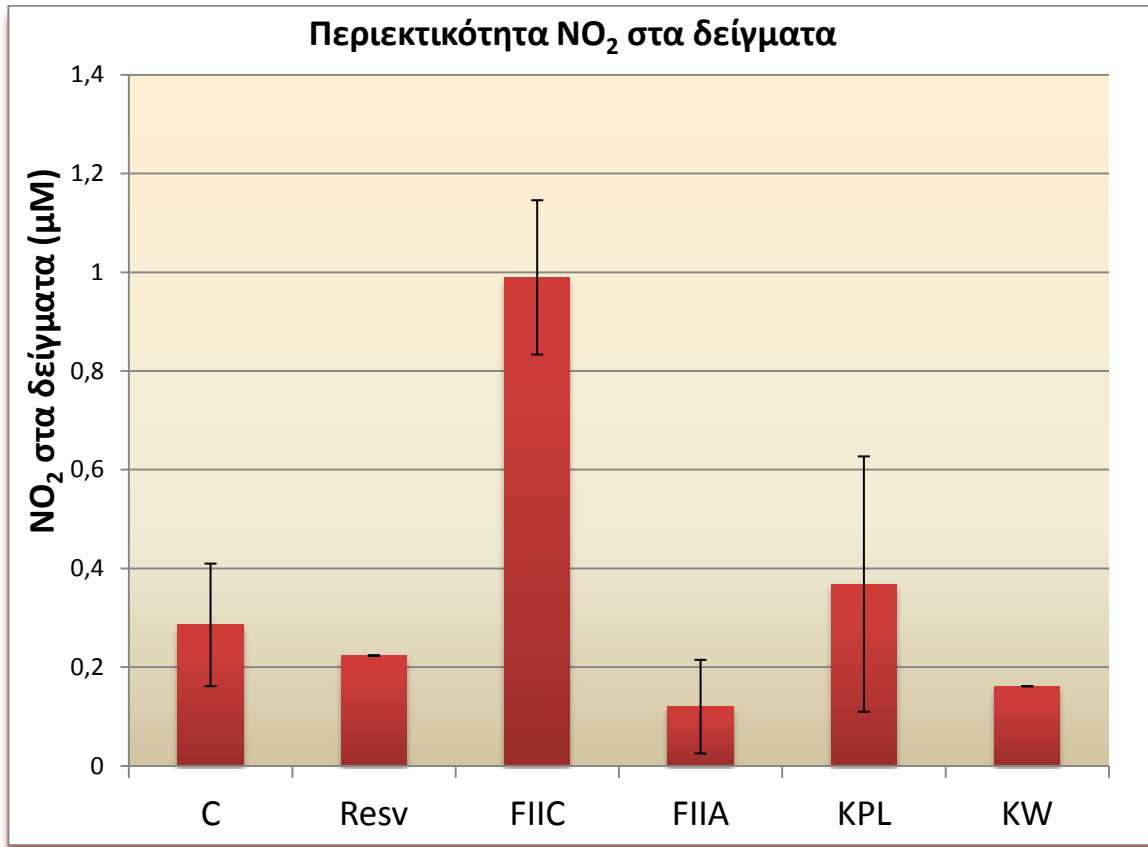
Έγινε αρχικά επίδραση εκχυλισμάτων κόκκινου (FIIC) και λευκού (FIIA) κρασιού, σε δύο συγκεντρώσεις 150 και 300 μg/ml καθώς και χορήγηση ρεσβερατρόλης 45μg/ml. Χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (Control-) και ένας θετικός μάρτυρας (Control +) για να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου στα κύτταρα PC3. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός και θετικός μάρτυρας και δύο συγκεντρώσεις

εκχυλίσματος κολοκυθόσπορου που περιείχε τα πολικά λιποειδή (150 και 300 $\mu\text{g/ml}$) και εκχυλίσματος κολοκυθόσπορου σε υδατική φάση (200 και 400 $\mu\text{g/ml}$). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο είναι εξοπλισμένο με ειδικό πράσινο φίλτρο ευρέως φάσματος (Nikon).

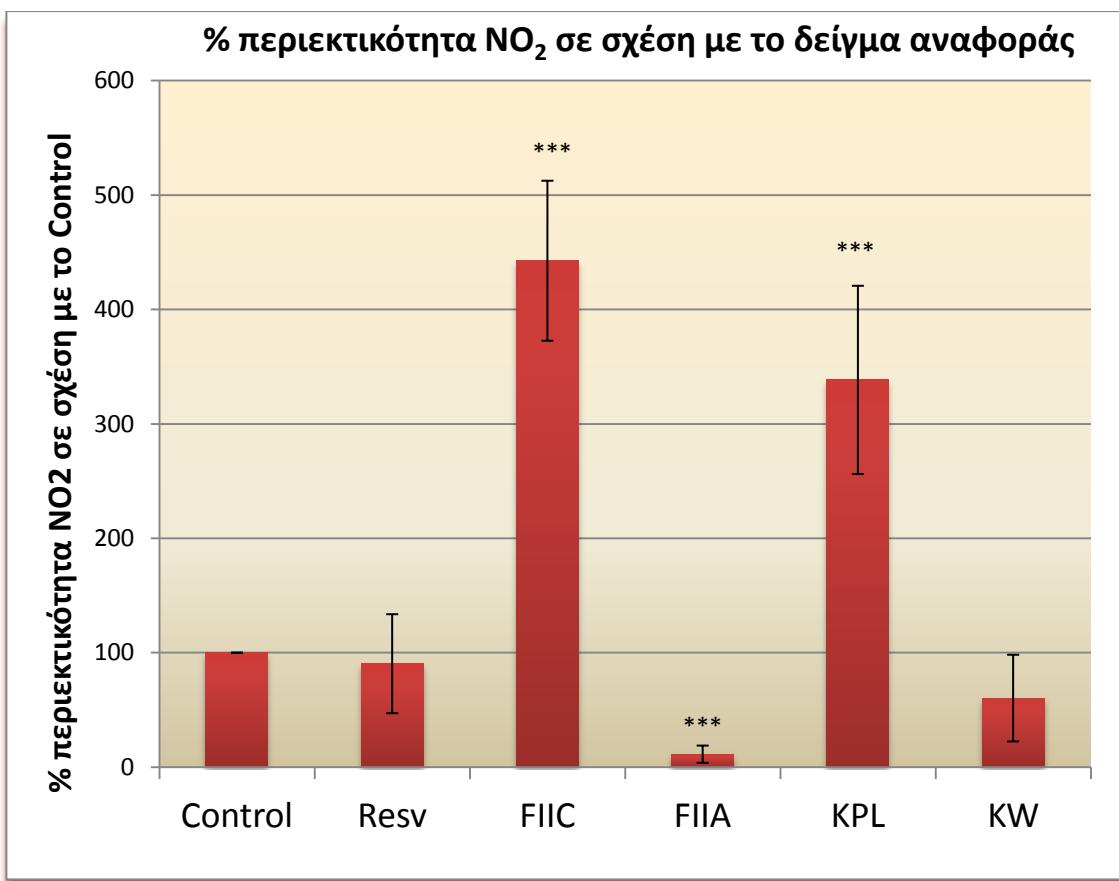
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) Προσδιορισμός νιτρωδών (NO_2)



Τα αποτελέσματα από το πείραμά μας τα ποσοτικοποιούμε μέσω της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάσαμε στην πειραματική διαδικασία.

Μετατρέψαμε ακολούθως τα δεδομένα σε ποσοστιαία διαφορά περιεκτικότητα NO_2 σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς.

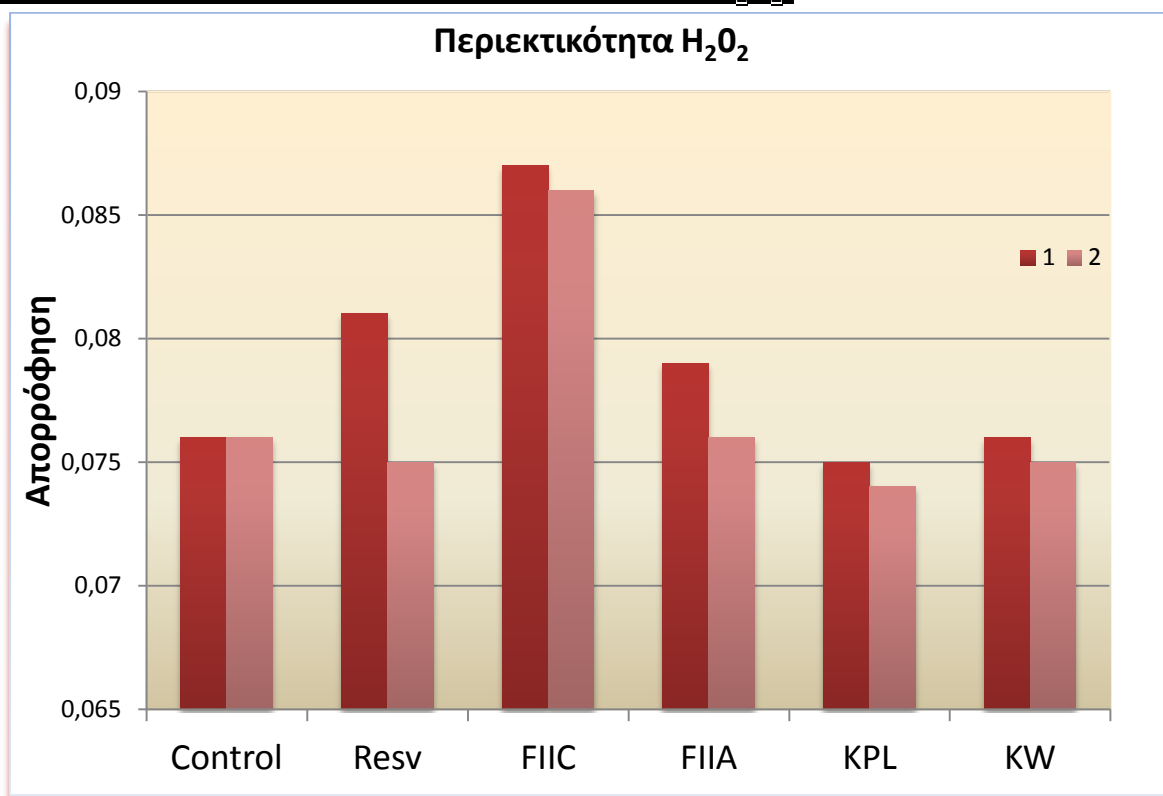


*** : Η διαφορά στην περιεκτικότητα NO₂ μεταξύ του Control και των δειγμάτων FIIC, FIIA, KPL είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με τη στατιστική μέθοδο ANOVA ($p < 0.05$).

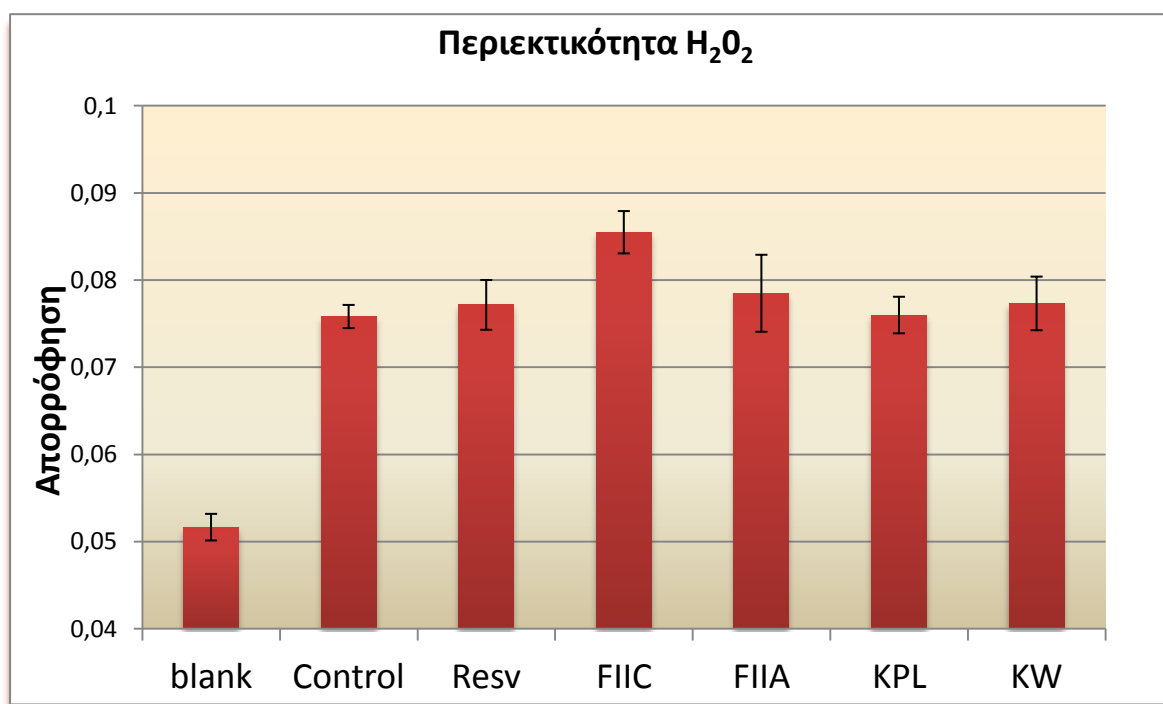
Παρατηρώντας τα πιο πάνω γραφήματα βλέπουμε μια αύξηση της ποσότητας των νιτρωδών μετά από την επίδραση του εκχυλίσματος του κόκκινου κρασιού (FIIC) και μια αύξηση μετά από την επίδραση με το εκχύλισμα κολοκυθόσπορου σε πολικά λιποειδή (KPL), σε μικρότερο όμως βαθμό. Τα αποτελέσματα για τα δύο αυτά εκχυλίσματα είναι και στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς ($p < 0.00$, $p < 0.05$ αντίστοιχα).

Μετά από την προσθήκη ρεσβερατρόλης, εκχυλίσματος λευκού κρασιού (FIIA) και κολοκυθόσπορου (KW) παρατηρήθηκε κάποια μείωση στην περιεκτικότητα NO₂ σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, όμως μόνο για το εκχύλισμα λευκού κρασιού το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό ($p < 0.00$). Φαίνεται ότι με την επίδραση με λευκό κρασί μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η περιεκτικότητα NO₂ στα PC-3.

Β) Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

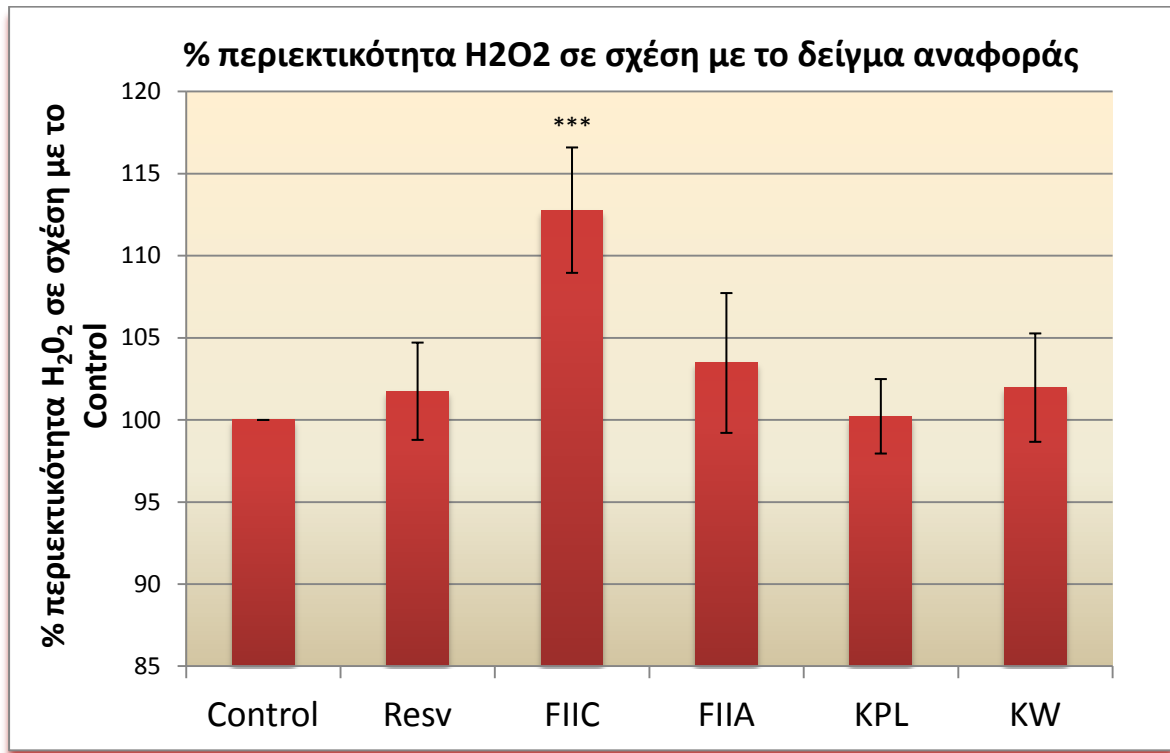


Περιεκτικότητα H_2O_2 στα δείγματα και από τα δύο πειράματα (διπλές μετρήσεις)



Μέσος όρος περιεκτικότητας H_2O_2 από τις δύο μετρήσεις

Τα αποτελέσματα από το πείραμά μας τα ποσοτικοποιούμε μέσω σύγκρισης της περιεκτικότητας H_2O_2 με το δείγμα αναφοράς (Control).



*** : $p < 0.05$

Η διαφορά στην περιεκτικότητα H_2O_2 μεταξύ του Control και του δείγματος FIIC (κόκκινο κρασί) είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με τη στατιστική μέθοδο ANOVA.

Παρατηρώντας τα πιο πάνω γραφήματα βλέπουμε μια σημαντική αύξηση της ποσότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου μετά από την επίδραση του εκχύλισματος του κόκκινου κρασιού (FIIC). Τα αποτελέσματα για το εκχύλισμα αυτό είναι και στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς ($p < 0.00$).

Αύξηση σε σχέση με το δείγμα αναφοράς παρατηρείται και μετά από την επίδραση με τη ρεσβερατρόλη, το εκχύλισμα λευκού κρασιού και κολοκυθόσπορου KW ($p=0.336$, $p=0.062$, $p=0.280$ αντίστοιχα). Το εκχύλισμα κολοκυθόσπορου με τα πολικά λιποειδή (KPL) δεν παρουσιάζει αύξηση στην περιεκτικότητα του σε H_2O_2 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς ($p = 0.902$).

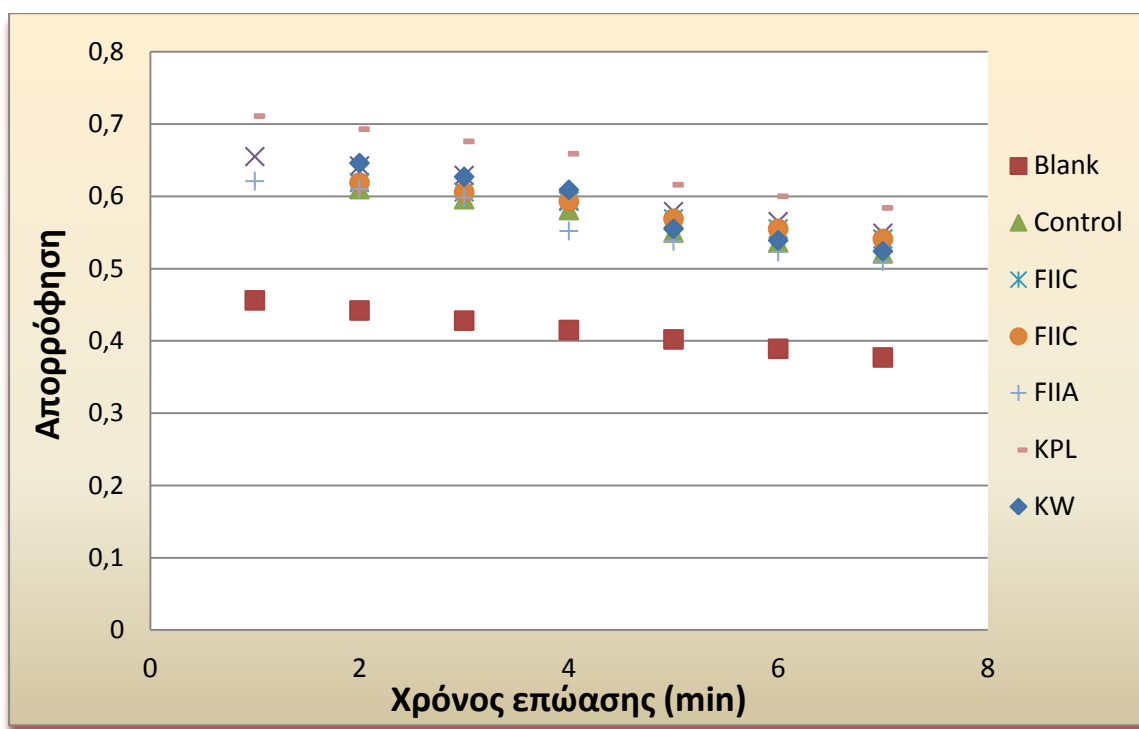
Γ) Δραστικότητα ενζύμου υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX-1) σε ομογενοποίημα PC-3 απουσία και παρουσία εκχυλισμάτων. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) καταλύει την αναγωγή των υπεροξειδίων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, από την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτική βλάβη.

Ο έμμεσος σκοπός αυτού του πειράματος είναι να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα στα καρκινικά κύτταρα PC3 μέσω του υπολογισμού της δραστικότητας του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX-1).

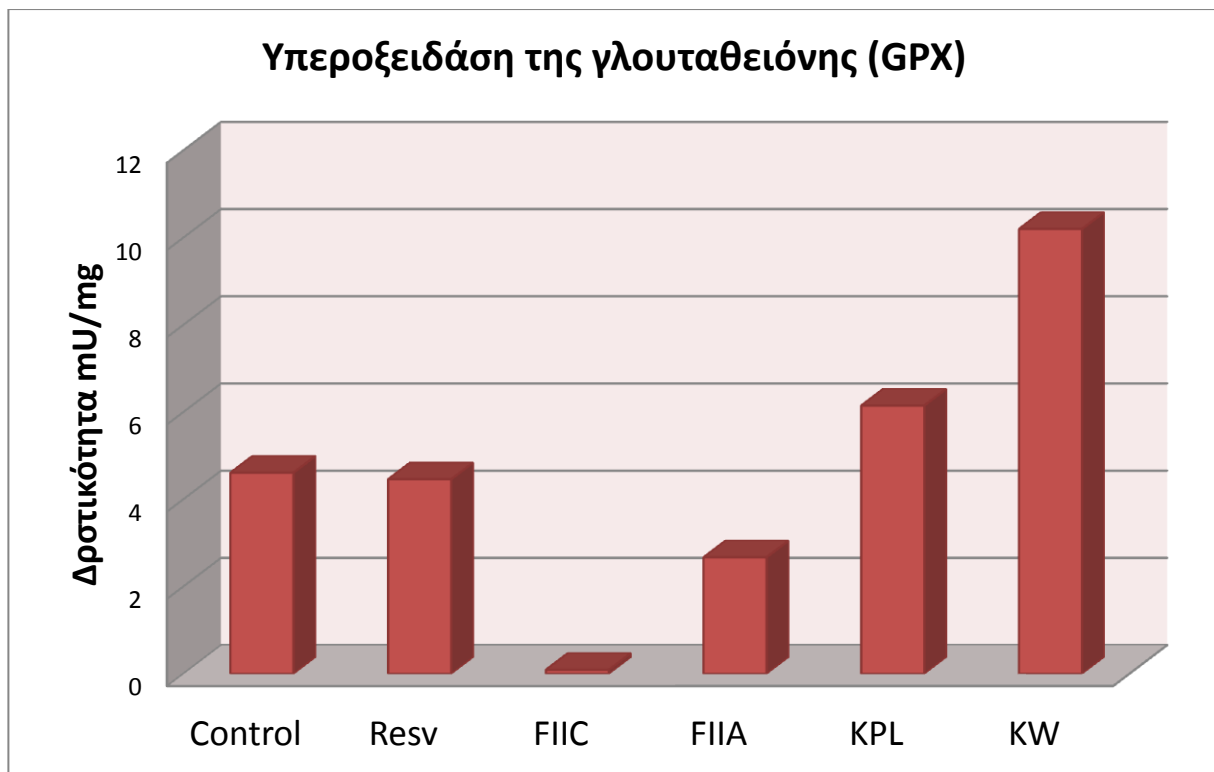
Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την κυτταρική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη όπως προσδιορίζεται από τη μέθοδο Bradford, έτσι ώστε η δραστικότητα του ενζύμου να είναι εκφρασμένη ως προς τα g πρωτεΐνης του δείγματος.

Παρατίθενται παρακάτω οι μεταβολές στην απορρόφηση στα control δείγματα όσο και στα δείγματα που περιείχαν εκχυλίσματα.



Διάγραμμα μείωσης απορρόφησης για τα δείγματα.

Η ταχύτητα μείωσης της απορρόφησης μεταξύ του τυφλού (blank) και των εκχυλισμάτων παρουσιάζουν κάποιες μικρές διαφορές. Η ταχύτητα μείωσης της απορρόφησης μετά την επίδραση εκχυλίσματος κολοκυθόσπορου τόσο με τα πολικά λιποειδή (KPL) όσο και στην υδατική φάση (KW) φαίνεται να είναι μεγαλύτερη, οπότε και η δραστικότητα του ενζύμου θα είναι μεγαλύτερη. Για να δούμε με πιο αποτελεσματικό και ξεκάθαρο τρόπο τα αποτελέσματα από το πείραμά μας παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα και με την παρακάτω μορφή όπου φαίνεται η δραστικότητα του ενζύμου σε σχέση με το κάθε εκχύλισμα που προστέθηκε.

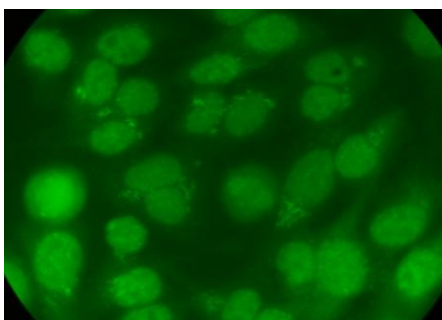


Μεταβολή της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα δείγματα.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα αυτό, η δραστικότητα της GPX-1, ύστερα από επίδραση με τη ρεσβερατρόλη στα κύτταρα PC3, δε φαίνεται να παρουσιάζει καμία μεταβολή, σε σχέση με το control. Μετά από την επώαση με το εκχύλισμα κόκκινου κρασιού (FIIC) η δραστικότητα της υπεροξειδάσης μειώνεται κατά πολύ, σχεδόν μηδενίζεται. Όσον αφορά την μεταβολή της δραστικότητας μετά την επίδραση από το εκχύλισμα του λευκού κρασιού (FIIA) και πάλι φαίνεται να μειώνεται σε σχέση με το control αλλά όχι στο επίπεδο που μειώθηκε από το κόκκινο κρασί. Τα εκχυλίσματα κολοκυθόσπορου, τόσο στην υδατική φάση (KW) όσο και αυτό που περιέχει τα πολικά λιποειδή (KPL) προκαλούν αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου GPX-1 και ιδιαίτερα το υδατικό εκχύλισμα κολοκυθόσπορου.

Δ) Αποτελέσματα μηχανισμού αυτοφαγίας

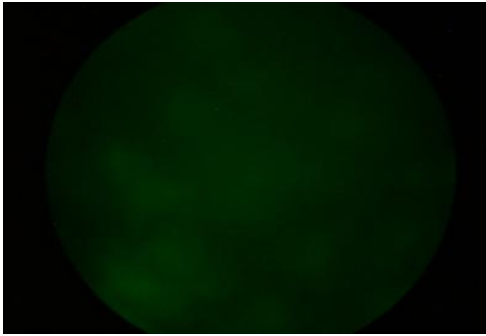
Θετικό Control πρόκλησης αυτοφαγίας (Chloroquine 50μM)



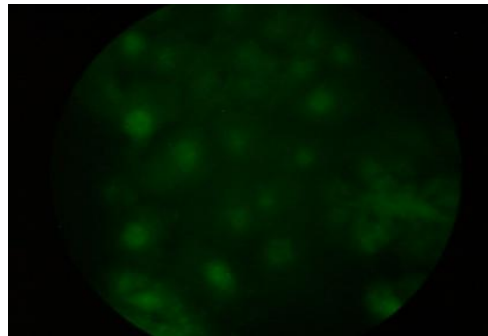
Ως θετικό control πρόκλησης αυτοφαγίας χρησιμοποιήθηκε η χλωροκίνη. Η χλωροκίνη αναστέλλει τη σύντηξη των λυσοσωμάτων με τα αυτοφαγοσώματα και απενεργοποιεί τα λυσοσωμικά ένζυμα. Έτσι αναστέλλει την αποικοδόμηση της LC3 πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την συσσώρευση και τη διάχυτη ανίχνευσή της.

Αποτελέσματα από την ανάλυση ανοσοφθορισμού από τα εκχυλίσματα κόκκινου (FIIC) και λευκού κρασιού (FIIA) στα PC3 καρκινικά κύτταρα προστάτη.

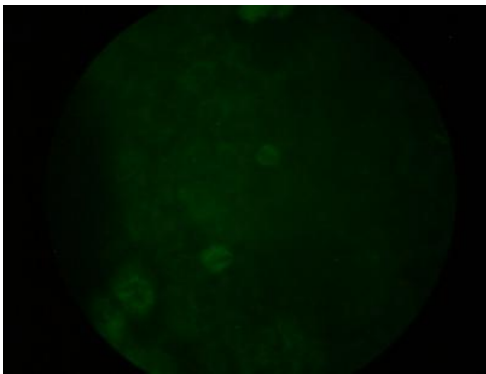
CTRL (-)



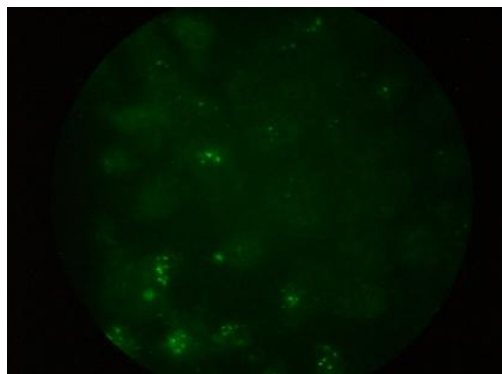
CTRL (+)



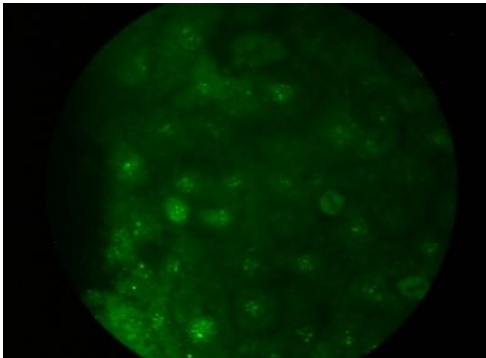
FIIC (150μg/mL)



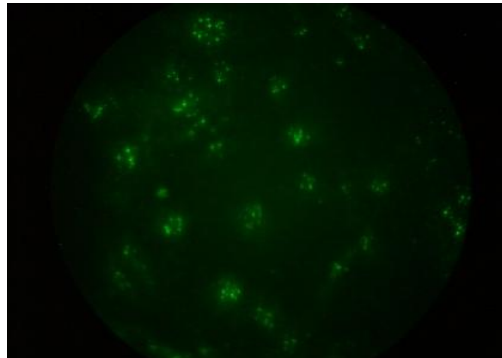
FIIC (300μg/mL)



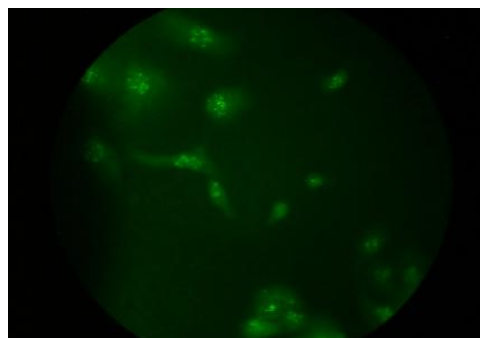
FIIA (150μg/mL)



FIIA (300μg/mL)



RESV (45μg/mL)



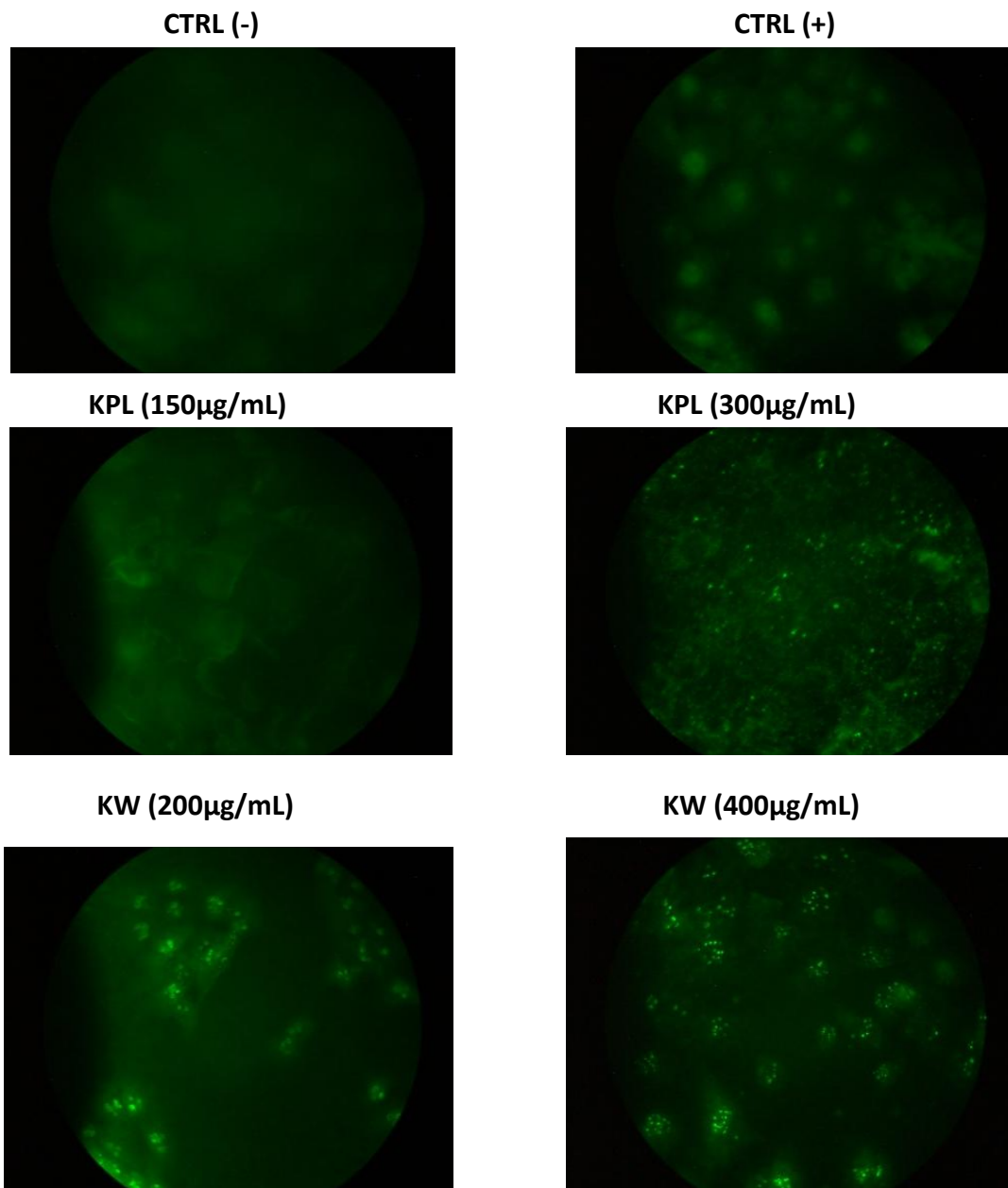
Εικόνες σε
μεγέθυνση
60X

Παρατηρήθηκε ανίχνευση της πρωτεΐνης LC3 με ανοσοφθορισμό στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον των PC-3 κυττάρων μετά από επώαση με εκχυλίσματα κρασιού και την πρότυπη φαινολική ένωση, τη ρεσβερατρόλη. Τα κύτταρα ελέγχου (τα οποία δεν έλαβαν καμία επίδραση) εμφανίζουν φθορισμό ασθενέστερο σε σύγκριση με τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση των εκχυλισμάτων, τα οποία επιδεικνύουν συγκεκριμένα περιπυρηνικό εντοπισμό της LC3. Οι αρνητικοί έλεγχοι δεν δείχνουν ούτε πυρηνική ούτε κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού.

Μετά από την επίδραση με ρεσβερατρόλη (45μg/mL) παρατηρούμε ότι γίνεται εντονότερος ο φθορισμός συγκρινά με το θετικό μάρτυρα όπου δείχνει το φθορισμό που έχουν αυτούσια τα καρκινικά κύτταρα PC-3.

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα κρασιού, παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του κόκκινου κρασιού (FIIC) η ανίχνευση της πρωτεΐνης LC3 και άρα η ύπαρξη αυτοφαγικής δραστηριότητας αυξάνεται (από 150 στα 300μg/mL). Επομένως η αυτοφαγία είναι δοσοεξαρτώμενη για το FIIC. Αντίθετα, στο λευκό κρασί (FIIA) παρατηρείται έντονος φθορισμός ακόμα και στα 150μg/mL.

Αποτελέσματα από την ανάλυση φθορισμού από τα εκχυλίσματα κολοκυθόσπορου στα PC3 καρκινικά κύτταρα προστάτη.



Εικόνες σε
μεγέθυνση 60X

Ανίχνευση της LC3 πρωτεΐνης στα κύτταρα PC-3 μετά από επώαση με εκχυλίσματα κολοκυθόσπορου. Τα κύτταρα ελέγχου (τα οποία δεν έλαβαν καμία επίδραση) εμφανίζουν ασθενή φθορισμό σε σύγκριση με τα επεξεργασμένα κύτταρα τα οποία

επιδεικνύουν συγκεκριμένα περιπυρηνικό εντοπισμό της LC3. Οι αρνητικοί έλεγχοι δεν δείχνουν ούτε πυρηνική ούτε κυτταροπλασματική ένταση φθορισμού.

Μετά από την επίδραση με εκχυλίσμα κολοκυθόσπορου που περιέχει τα πολικά λιποειδή KPL (και στις δύο συγκεντρώσεις) παρατηρούμε ότι γίνεται εντονότερος ο φθορισμός και ότι υφίσταται αυτοφαγική δραστηριότητα, η οποία είναι και δοσοεξαρτώμενη, αυξάνεται δηλαδή με την αύξηση της συγκέντρωσης του KPL.

Έντονο ανοσοφθορισμό παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα κολοκυθόσπορου που βρίσκονται σε υδατική φάση (KW) ακόμα και στη συγκέντρωση των 200μg/mL. Η παρουσία της πρωτεΐνης LC3 είναι πιο εμφανής και δίνει ξεκάθαρη εικόνα αυτοφαγικής δραστηριότητας.

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος στον προστάτη αδένα, τα τελευταία χρόνια έχει πάρει τη μορφή επιδημίας, αφού προσβάλλει ολοένα και περισσότερο αριθμό ανδρών, κυρίως ηλικιωμένων. Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση μικροθρεπτικών συστατικών που περιέχονται σε τρόφιμα θα μπορούσαν να έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία. Προκειμένου να ερευνήσουμε την επίδραση εκχυλισμάτων από λευκό και κόκκινο κρασί, καθώς και από κολοκυθόσπορο, στον καρκίνο του προστάτη, καλλιεργήσαμε καρκινικά προστατικά κύτταρα PC-3, στα οποία χορηγήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων αυτών.

Αρχικά προσδιορίσαμε την συγκέντρωση νιτρωδών (NO_2) μετά την επίδραση των εκχυλισμάτων στα κύτταρα PC-3, έτσι ώστε να ανιχνεύσουμε με έμμεσο τρόπο τα επίπεδα του NO (μονοξειδίου του αζώτου). Από το πείραμα μας παρατηρήσαμε ότι μετά την κατεργασία με το κόκκινο κρασί τα νιτρώδη αυξήθηκαν στα κύτταρα PC-3 και αυτό είναι και στατιστικά σημαντικό. Σε αντίστοιχη μελέτη, παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή του NO μετά από την επίδραση των πολυφαινολών του κρασιού στα κύτταρα PC-3, δηλαδή το αντίθετο αποτέλεσμα.^[68] Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση των νιτρωδών μετά την επίδραση του εκχυλίσματος κολοκυθόσπορου με πολικά λιποειδή (KPL). Το λευκό κρασί προκάλεσε μεγάλη μείωση των επιπέδων των νιτρωδών στα κύτταρα PC-3. Μετά την κατεργασία με ρεσβερατρόλη δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή σε σχέση με το Control, παρά μόνο μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης των NO_2 (όχι στατιστικά σημαντικό). Μελέτη της επίδρασης της ρεσβερατρόλης σε κυτταρική σειρά αστροκυττάρων αναφέρει μείωση των νιτρωδών μετά από επώαση με ρεσβερατρόλη.^[114]

Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στον καρκίνο είναι διττός. Το NO από τη μια αναφέρεται ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, επάγει τη διαφοροποίηση και συμμετέχει στη μείωση της μεταστατικής εξάπλωσης σε

διαφορετικές κυτταρικές γραμμές όγκου.^[68] Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις NO παρουσιάζουν αντι-ογκογόνο δράση. Από την άλλη πλευρά, το NO και τα παράγωγα του είναι πολύ δραστικά μόρια που προκαλούν αλλαγές στη δομή του DNA είτε μόνα τους είτε αλληλεπιδρώντας με τις ROS με αποτέλεσμα τη συσσώρευση καρκινογόνων μεταλλάξεων και επαγωγή του καρκίνου. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μία αυξημένη έκφραση του ενζύμου συνθάση του NO (NOS) σε ανθρώπινους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη, καθώς και μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου, έναρξης ή και εξέλιξης της νόσου.^[68]

Στη συνέχεια προσδιορίσαμε την περιεκτικότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) στα κύτταρα PC-3 μετά την επίδραση των εκχυλίσμάτων. Η ρεσβερατρόλη καθώς και τα εκχυλίσματα κόκκινου και λευκού κρασιού και κολοκυθόσπορου KW παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα H_2O_2 σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Ωστόσο μόνο το αποτέλεσμα για το εκχύλισμα του κόκκινου κρασιού (FIIC) τα αποτελέσματά μας είναι στατιστικά σημαντικά.

Σε πρόσφατη μελέτη μετά από επώαση με ρεσβερατρόλη (σε συγκεντρώσεις 10 μ M και 25 μ M για 72h) σε καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση έγινε τόσο σε προστατικά PC-3 κύτταρα όσο και σε HepG2 κύτταρα, και σε μικρότερο βαθμό σε MCF-7 κύτταρα καρκίνου του μαστού.^[115] Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε μια έρευνα μετά από επίδραση της αδριαμικίνης, ενός αντικαρκινικού φαρμάκου, στα καρκινικά κύτταρα PC-3, όπου παρατηρείται αύξηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα αυτά. Η παραγωγή του H_2O_2 είναι μία φυσιολογική διαδικασία στο κυτταρόπλασμα και σε διάφορα οργανίδια. Αυτή η παραγωγή H_2O_2 , σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στο DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια ή και εξάντληση των αντιοξειδωτικών του κυττάρου. Η κυτταρική βλάβη θα μπορούσε να προέρχεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται ή το σχηματισμό υπεροξυνιτρικού (ONOO). Η ανίχνευση αυτής της αύξησης σε H_2O_2 , όταν εκτίθενται τα καρκινικά κύτταρα στο κόκκινο κρασί δείχνει μια συγκεκριμένη οξειδωτική εκδήλωση.^[116] Η καρκινική κυτταρική σειρά PC-3, σύμφωνα με πειραματικές μελέτες περιλαμβάνει αυξημένη ποσότητα ελευθέρων ριζών και υψηλό ποσοστό παραγωγής H_2O_2 .^[117]

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι σε θέση να επηρεάζει μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών. Αν και η ένωση αυτή αποτελεί μέρος των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), έχει χαμηλότερη βιολογική δραστηριότητα σε σύγκριση με άλλες ROS. Αυτή η χαμηλότερη δραστηριότητα σε συνδυασμό με την ικανότητά της να διασχίζει εύκολα μεμβράνες και να διαχέεται ελεύθερα μέσα και έξω από τα κύτταρα και τους ιστούς κάνουν το H_2O_2 ένα υποψήφιο μόριο τόσο για δια- όσο και για την ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Έτσι, το H_2O_2 μπορεί είτε να λειτουργήσει ως δεύτερος

αγγελιοφόρος που διεγείρει καταρράκτες κινασών σε συνδυασμό με την απόπτωση ή μπορεί να συμμετάσχει στο ρυθμιστικό έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, το H_2O_2 μπορεί να επάγει απόπτωση μέσω πολλών διαφορετικών οδών, μία από αυτές περιλαμβάνει το DNA που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στο H_2O_2 . Αν η έκθεση προκαλέσει παρατεταμένη βλάβη του DNA, αυτό προκαλεί επαγωγή του κυτταρικού θανάτου είτε μέσω απόπτωσης είτε μέσω νέκρωσης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί επίσης να επάγει απόπτωση μέσω λυσοσωματικής ρήξης.^[118]

Σε μια έρευνα ο Zhao et al. αναφέρεται στο ότι ο συνδυασμός του H_2O_2 και του οξειδοαναγωγικά δραστικού σιδήρου μπορεί να παράγει $OH \cdot$ μέσω της αντίδρασης του Fenton. Αυτό οδηγεί σε υπεροξείδωση της λυσοσωματικής μεμβράνης και επακόλουθη ρήξη και απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά μπορούν στη συνέχεια να επιτεθούν άμεσα στα μιτοχόνδρια και να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Έτσι, αυτό μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο ενεργοποιεί κασπάσες και τελικά διεγείρει την απόπτωση.^[119] Ωστόσο, μέχρι στιγμής, η ευαισθησία των ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου του προστάτη σε H_2O_2 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.^[118]

Μια πρόσφατη μελέτη μετά από επίδραση μιας πολυφαινολικής ένωσης (υδροξυτυροσόλη) σε καρκινικά κύτταρα PC-3 αναφέρει ότι τα εξωκυττάρια ROS (υδροϋπεροξείδιο και υπεροξείδιο υδρογόνου) μπορεί να διευκολύνουν την αντι-πολλαπλασιαστική δράση της ένωσης αυτής και να επάγουν την απόπτωση.^{[115] [120]} Επαγωγή της απόπτωσης σε προστατικά καρκινικά κύτταρα μετά από την επίδραση της α-τοκοφερόλης προκαλώντας συνθήκες περίσσειας αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και έκθεσης σε H_2O_2 , υποστηρίζουν και άλλες πρόσφατες έρευνες.^[121]

Επομένως, πολύ πιθανόν η επαγόμενη αύξηση του H_2O_2 από το κόκκινο και λευκό κρασί, τη ρεσβερατρόλη και το υδατικό διάλυμα κολοκυθόσπορου, να οφείλεται σε αυτό το μηχανισμό, στο να προκαλέσει δηλαδή αυξημένο οξειδωτικό στρες, για να επέλθει η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων.^[115]

Στην πειραματική μας εργασία μελετήσαμε επίσης και η μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX-1), που εμπλέκεται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κύκλου της γλουταθειόνης και συμμετέχει στην απομάκρυνση του δραστικού μορίου H_2O_2 αλλά και μιας μεγάλης ποικιλίας από υδροϋπεροξείδια, ανάγωντάς τα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα χαμηλότερα επίπεδα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) στην κυτταρική καρκινική σειρά προστάτη PC3.^[122]

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα δείγματά μας, φάνηκε να παρουσιάζει μικρές μεταβολές σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, ανάλογα με το δείγμα. Μετά την επίδραση με ρεσβερατρόλη δεν ανιχνεύθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στην δραστηριότητα, που μπορεί όμως να οφείλεται και στην αραίωση των

κυττάρων στο δείγμα. Μία πρόσφατη μελέτη στην οποία έγινε επίδραση ρεσβερατρόλης (10-100μΜ) για τον προσδιορισμό της επίδρασης στη δραστικότητα της GPX αλλά και άλλων ενζύμων, ομοίως δεν έδειξε καμία διαφορά στην δραστικότητα του ενζύμου GPX, μετά τη χορήγηση ρεσβερατρόλης.^[115]

Εντούτοις, σε μελέτες με ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή η κατεργασία των κυττάρων με ρεσβερατρόλη (25, 50 και 100μΜ) φάνηκε να προκαλεί μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.^[123] Η ρεσβερατρόλη επίσης προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα και αυτό είναι σημαντικό για την αγγειακή προστασία έναντι στο οξειδωτικό στρες.^[124]

Μετά την επίδραση με κόκκινο κρασί στα κύτταρα PC-3 παρατηρούμε ότι η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μειώθηκε πάρα πολύ. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα που έχει το κόκκινο κρασί από μόνο του, και επομένως να μη χρειάζεται τη βοήθεια της GPX για να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες. Αυτή βέβαια είναι μια υπόθεση, που μπορεί να εξηγεί την τόσο χαμηλή δραστικότητα της GPX μετά από επίδραση κόκκινου κρασιού. Και μετά από την επίδραση με εκχύλισμα λευκού κρασιού βλέπουμε μια μικρή μείωση στη δραστικότητα του ενζύμου GPX, που πιθανόν να εξηγείται με παρόμοιο τρόπο.

Μετά την επίδραση των εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου στα καρκινικά κύτταρα PC-3 παρατηρούμε αύξηση στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης τόσο μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος κολοκυθόσπορου σε υδατική φάση όσο και μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος με τα πολικά λιποειδή. Αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου και άρα προστασία έναντι στο οξειδωτικό στρες μετά από επίδραση με κολοκυθόσπορο, έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες σε άλλα κύτταρα, όμως ακόμη δεν έχουν γίνει μελέτες σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη. Για παράδειγμα, αυξημένη δραστικότητα της GPX, αλλά και βελτίωση ολόκληρου του κύκλου γλουταθειόνης παρατηρήθηκε με την επίδραση ενός υδατικού εκχυλίσματος κολοκύθας σε διαβητικά ποντίκια,^[125] αλλά και σε πειράματα με υπερτασικούς αρουραίους (+38% στη δραστικότητα της GPX).^[126]

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX-1) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TR), το πιο άφθονο αντιοξειδωτικό που περιέχει σεληνοπρωτεΐνες στα θηλαστικά, φαίνεται να εμπλέκονται στην ιδιότητα του σεληνίου να προστατεύει από την εμφάνιση συγκεκριμένων κακοηθειών στον άνθρωπο. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλύτερη γνώση της έκφρασης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της TR στον καρκίνο εξετάστηκε η δράση τους σε διαγονιδιακά ποντίκια (TGFA/c-myc) με όγκο ήπατος, σε ανθρώπινες προστατικές κυτταρικές σειρές και σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου για να μελετηθεί η δράση τους σε σχέση με το γονίδιο p-53. Βρέθηκε, ότι η TR επάγεται, ενώ η GPX1 καταστέλλεται στις κακοήθειες του ήπατος και του προστάτη, ενώ στην κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου, η έκφραση του p53

οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα της GPX1 αλλά λειτούργησε κατασταλτικά για την TR.^[127]

Σε αυτή τη μελέτη εξετάσαμε και το μηχανισμό αυτοφαγίας των καρκινικών κυττάρων του προστάτη της σειράς PC-3 μετά από την επίδραση των εκχυλισμάτων κρασιού και κολοκυθόσπορου. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω ανίχνευσης της LC3 πρωτεΐνης, η οποία σχετίζεται με τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος και είναι δείκτης της διαδικασίας της αυτοφαγίας.^[128]

Συγκρίναμε τα αποτελέσματά μας με το θετικό δείγμα αναφοράς (CTRL+) όπου δείχνει τα επίπεδα αυτοφαγικής δραστηριότητας στα προστατικά καρκινικά κύτταρα PC-3 χωρίς την επίδραση των εκχυλισμάτων. Στο αρνητικό control, δεν υπάρχει καμία επίδραση και δεν παρατηρείται καθόλου αυτοφαγική δραστηριότητα. Όσον αφορά στα εκχυλίσματα κόκκινου κρασιού και τη φαινολική ένωση ρεσβερατρόλη παρατηρήσαμε ανίχνευση της πρωτεΐνης LC-3 στα κύτταρα PC-3 και άρα επαγωγή της αυτοφαγικής δραστηριότητας. Στα εκχυλίσματα κόκκινου κρασιού (FIIIC) φαίνεται ότι τα επίπεδα αυτοφαγίας είναι δόσοεξαρτώμενα, δηλαδή αυξάνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για το λευκό κρασί όπου έχει ήδη έντονο φθορισμό από τη χαμηλή συγκέντρωση (150μg/mL). Η ρεσβερατρόλη σύμφωνα με τα ευρήματά μας επάγει την αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα PC-3. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με τα ευρήματα από άλλες μελέτες για το ότι η ρεσβερατρόλη προκαλεί αυτοφαγία σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των καρκινικών κυττάρων PC-3.^[129] Μελέτη σε καρκινικά κύτταρα ωοθηκών επιβεβαιώνει ότι η ρεσβερατρόλη προκαλεί τη συσσώρευση αυτοφαγοσώματων και την επαγωγή αυτοφαγίας. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνουν και άλλες μελέτες σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα, κύτταρα ενδομήτριου καρκίνου, κύτταρα σιελογόνων αδένων και σε κύτταρα MC-7 καρκίνου του μαστού (μετά από κατεργασία με 50μM ρεσβερατρόλης).^[130] Η επαγωγή της αυτοφαγίας από τη ρεσβερατρόλη, μπορεί να αποτελεί μια μορφή κυτταρικού θανάτου του καρκινικού κυττάρου, αλλά πολλοί υποστηρίζουν ότι η επαγόμενη από τη ρεσβερατρόλη αυτοφαγία μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό επιβίωσης σε ορισμένους τύπους καρκινικών κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί ότι η φαρμακολογική αναστολή της αυτοφαγίας ενισχύει την ενεργοποίηση της κασπάσης και το θάνατο των κυττάρων σε κύτταρα επωασμένα με ρεσβερατρόλη.^[129] Επίσης, η αναστολή της αυτοφαγίας έχει φανεί να ενισχύει κυτταροτοξικές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης σε κύτταρα γλοιώματος^[131] και η αναστολή της αυτοφαγίας είναι επίσης γνωστή για την ενίσχυση της επαγόμενης από τη θεραπεία απόπτωση σε κύτταρα λεμφώματος.^[129] Ωστόσο, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας καταστέλλει την απόπτωση^[132]. Σε άλλες πειραματικές μελέτες, αντίθετα με τα αποτελέσματά μας κατά τη χορήγηση ρεσβερατρόλης σε κακοήγη γλοιώματα εγκεφάλου έχει παρατηρηθεί αναστολή της αυτοφαγίας.^[133] Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η επαγωγή της αυτοφαγίας από τη ρεσβερατρόλη

ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες, ως δραστηριότητα είτε επιβίωσης ή με προ-αποπτωτική λειτουργία και εξαρτάται και από τον τύπο καρκινικών κυττάρων.

Μετά από την επίδραση με εκχύλισμα κολοκυθόσπορου με πολικά λιποειδή KPL (και στις δύο συγκεντρώσεις) παρατηρούμε δόσοεξαρτώμενο φθορισμό και άρα ύπαρξη αυτοφαγικής δραστηριότητας, αφού είναι εμφανής η συσσώρευση της LC-3 πρωτεΐνης. Έντονο ανοσοφθορισμό παρουσιάζει το υδατικό εκχύλισμα κολοκυθόσπορου (KOW). Η παρουσία της πρωτεΐνης LC3 είναι πιο εμφανής και δίνει ξεκάθαρη εικόνα αυτοφαγικής δραστηριότητας και στις δύο συγκεντρώσεις. Προς το παρόν δεν έχουν γίνει αντίστοιχες μελέτες με εκχυλίσματα κολοκυθόσπορου σε καρκινικά προστατικά κύτταρα και μελέτη του μηχανισμού της αυτοφαγίας σε αυτά, αλλά είναι ένα πεδίο το οποίο φαίνεται να έχει μέλλον και προοπτικές για θεραπεία του καρκίνου του προστάτη. Μία μελέτη που έχει γίνει με το συστατικό *Benzyl isothiocyanate*, το οποίο ανευρίσκεται στα σταυρανθή λαχανικά όπως είναι η κολοκύθα, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού αποκάλυψε και ενδείξεις επαγόμενης αυτοφαγίας στα κύτταρα αυτά.^[134]

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω ο ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο έχει δύο όψεις. Η αυτοφαγία μπορεί να λειτουργήσει τόσο για την προαγωγή όσο και στην πρόληψη του καρκίνου, και ο ρόλος της μπορεί να τροποποιηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου.^[111] Από τα αποτελέσματά μας παρατηρήσαμε ότι τα εκχυλίσματα κρασιού και κολοκυθόσπορου επάγουν την αυτοφαγική δραστηριότητα στα PC-3 προστατικά καρκινικά κύτταρα, όμως η σχέση μεταξύ του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων και της αυτοφαγίας χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι τα εκχυλίσματα από τα κρασιά και τον κολοκυθόσπορο αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω και ενδεχομένως να συνεισφέρουν στην πρόληψη ή και αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αθ., Κ., *Προστάτης: Μύθος και Πραγματικότητα*. 1997: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
2. Sudhakar, A., *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. J Cancer Sci Ther 2009: p. 1-4.
3. *The History of Cancer*, American Cancer Society 2009.
4. Kirby RS, C.T., Brawer M., *Prostate cancer*. In : *Chapter 2 Anatomical and pathological considerations*. Mosby Times Mirror International 1998: p. 2-21.
5. Fine S, R.V., *Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer*. Histopathology 2012: p. 142-52.
6. Tortora, G.J., *Tenth Edition Principles of Human Anatomy*. Community College Wiley, 2005: p. 847.
7. Arthur C, G., John E. Hall, *Textbook of Medical Physiology 11e*. 2006: p. 1145.
8. Frick J, A.W., *Physiology of the prostate*, ed. Infection. 1991.
9. Caplan, A. and A. Kratz, *Prostate-specific antigen and the early diagnosis of prostate cancer*. Am J Clin Pathol, 2002. 117 Suppl: p. S104-8.
10. Deborah C Burford, M.K., Joan Austoker, *Prostate Cancer Risk Management Programme Information for primary care; PSA testing in asymptomatic men Evidence document.2010 NHS Cancer Screening Programmes*.
11. Venderbos, L.D. and M.J. Roobol, *PSA-based prostate cancer screening: the role of active surveillance and informed and shared decision making*. Asian J Androl, 2011. 13(2): p. 219-24.
12. Stamey, T.A., et al., *Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer*. Cancer, 1993. 71(3 Suppl): p. 933-8.
13. Loeb, S. and W.J. Catalona, *Prostate-specific antigen screening: pro*. Curr Opin Urol, 2010. 20(3): p. 185-8.
14. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. 127(12): p. 2893-917.
15. UK, C.R., *Registered charity in England and Wales (1089464), Scotland (SC041666) and Isle of Man (1103)2012*.
16. Rebecca Siegel, D.N., Ahmedin Jemal, *Cancer Statistics*. Ca Cancer J Clin, 2013: p. 11-30.
17. Siegel R, W.E., Brawley O, Jemal A *Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths*. Ca Cancer J Clin p. 212-236.
18. J. Ferlay, P.A., M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet & P. Boyle, *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Annals of Oncology, 2007.
19. Bray F, S.R., Ferlay J, Parkin D, *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002: p. 99–166.
20. Brawley, O.W., *Prostate cancer epidemiology in the United States*. World J Urol, 2012. 30(2): p. 195-200.
21. United States Cancer Statistics, *National program of cancer registries (NPCR)2009*.
22. Grönberg, H., *Prostatacancer – epidemiologi - Bakgrundsdokumentation*. Information från Läkemedelsverket 2003.

23. Devesa, A.W.H.a.S.S., *Trends and Patterns of Prostate Cancer: What Do They Suggest?* . The Johns Hopkins University Bloomberg School of Public Health 2001. 23.
24. Chu, L.W., et al., *Prostate cancer incidence rates in Africa*. Prostate Cancer, 2011. 2011: p. 947870.
25. Delongchamps NB, S.A., Haas GP, *Epidemiology of prostate cancer in Africa: another step in the understanding of the disease?* . Curr Probl Cancer, 2007.
26. Shitiu., J.O.O.a.O.B., *Increased Incidence of Prostate Cancer in Nigerians*. J of the National Medical Association.1 1999. 91(3).
27. Park, S.K., et al., *Rising prostate cancer rates in South Korea*. Prostate, 2006. 66(12): p. 1285-91.
28. Lee, S.K. and J. Sobal, *Socio-economic, dietary, activity, nutrition and body weight transitions in South Korea*. Public Health Nutr, 2003. 6(7): p. 665-74.
29. Li, J., et al., *Recent trends in prostate cancer incidence by age, cancer stage, and grade, the United States, 2001-2007*. Prostate Cancer, 2012: p. 691380.
30. Wilson, K.M., E.L. Giovannucci, and L.A. Mucci, *Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer*. Asian J Androl, 2012. 14(3): p. 365-74.
31. Thompson, I.M., et al., *Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(8): p. 529-34.
32. Ferris-i-Tortajada, J., et al., *[Constitutional risk factors in prostate cancer]*. Actas Urol Esp, 2011. 35(5): p. 282-8.
33. Thompson, I.M., Jr., et al., *The Prostate Cancer Prevention Trial: Current status and lessons learned*. Urology, 2001. 57(4 Suppl 1): p. 230-4.
34. H, R.P., Bernstein L, Yatani R, Henderson B, Mack T, *Cancer of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles county*. Br J Cancer, 1991: p. 963-966.
35. Giovannucci, E., et al., *Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study*. Int J Cancer, 2007. 121(7): p. 1571-8.
36. al, A.E.e., *Does Positive Family History of Prostate Cancer Increase the Risk of Prostate Cancer on Initial Prostate Biopsy?* Oncology, Urology, 2013.
37. Carter, B.S., et al., *Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features*. J Urol, 1993. 150(3): p. 797-802.
38. Zeegers, M.P., A. Jellema, and H. Ostrer, *Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis*. Cancer, 2003. 97(8): p. 1894-903.
39. Lichtenstein, P., et al., *Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland*. N Engl J Med, 2000. 343(2): p. 78-85.
40. Bratt, O., *Hereditary prostate cancer: clinical aspects*. J Urol, 2002. 168(3): p. 906-13.
41. al., J.K.B.e., *Weight change and prostate cancer incidence and mortality*. Int. J. Cancer : 131, 2012: p. 1711-1719.
42. Gong, A.R.K.a.Z., *Obesity and prostate cancer mortality*. Future Oncology 2007. 3(5): p. 557-567.
43. Littman, A.J., E. White, and A.R. Kristal, *Anthropometrics and prostate cancer risk*. Am J Epidemiol, 2007. 165(11): p. 1271-9.

44. Giovannucci, E., et al., *Body mass index and risk of prostate cancer in U.S. health professionals*. J Natl Cancer Inst, 2003. 95(16): p. 1240-4.
45. Leslie Bernstein, Y.L., and Katherine D. Henderson N.A. Berger, *Chapter 7 Physical Activity and Cancer*. Springer Science+Business Media, 2010.
46. Friedenreich, C.M. and M.R. Orenstein, *Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms*. J Nutr, 2002. 132(11 Suppl): p. 3456S-3464S.
47. Giovannucci, E.L., et al., *A prospective study of physical activity and incident and fatal prostate cancer*. Arch Intern Med, 2005. 165(9): p. 1005-10.
48. Sies H, S.W., *Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants*. Am J Clin Nutr 1995(1315S–21S).
49. Wolk, A., *Diet, lifestyle and risk of prostate cancer* Division of Nutritional Epidemiology. The National Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet , Stockholm, Sweden, Acta Oncologica, 2005: p. 44:277 / 281.
50. Giovannucci, E., et al., *A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(5): p. 391-8.
51. Yang, C.S., et al., *Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols*. Cancer Lett, 2013.
52. Fleshner N, F.W., Huryk R, Heston W, *Vitamin E inhibits the high-fat promoted growth of established human prostate LNCaP tumours in nude mice*. J UROL, 1999: p. 161: 1651–1654.
53. Klein, E.A., et al., *Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. JAMA, 2011. 306(14): p. 1549-56.
54. Fadi Abu-Shahin, W.S., Victoria Ramsauer and Koyamangalath Krishnan, *A Summary of the Prostate Cancer, Prevention Trials With a Focus on the Role of Vitamin E, Home Health Care Management & Practice* SAGE Publications Reprints and permission:sagepub.com/journals 2013.
55. Hurst, R., et al., *Selenium and prostate cancer: systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2012. 96(1): p. 111-22.
56. Allen, N., *Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. British Journal of Cancer 2008(98): p. 1574 – 1581.
57. Chan, J.M., et al., *Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study*. Am J Clin Nutr, 2001. 74(4): p. 549-54.
58. Newmark, H.L. and R.P. Heaney, *Dairy products and prostate cancer risk*. Nutr Cancer, 2010. 62(3): p. 297-9.
59. Yin, L., et al., *Meta-analysis of longitudinal studies: Serum vitamin D and prostate cancer risk*. Cancer Epidemiol, 2009. 33(6): p. 435-45.
60. al, R.C.T.e., *Serum Vitamin D and Risk of Prostate Cancer in a Case-Control Analysis Nested Within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. American Journal of Epidemiology 2009.
61. Ahonen, M.H., et al., *Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland)*. Cancer Causes Control, 2000. 11(9): p. 847-52.
62. Feher, J., G. Lengyel, and A. Lugasi, *[Cultural history of wine, the theoretical background of wine therapy]*. Orv Hetil, 2005. 146(52): p. 2635-9.
63. Soleas G, D.E., Goldberg D, *Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention*. J Clin Lab Anal 1997(11): p. 287-313.
64. Estreicher, S.K., *Wine the past 7,400 years*. 2004.

65. Frampton, A.E. and J. Stebbing, *Raising a glass of red wine against cancer, or not?* Lancet Oncol, 2012. 13(7): p. 669-70.
66. Johnson, H., *Johnson's Modern Encyclopedia Of Wine*
67. Ac Cordova, B.S., *Polyphenols are medicine: is it time to prescribe red wine for our patients?* int J Angiol, 2009(18): p. 111-117.
68. Kampa, M., et al., *Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines.* Nutr Cancer, 2000. 37(2): p. 223-33.
69. Arranz, S., et al., *Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer.* Nutrients, 2012. 4(7): p. 759-81.
70. Dohadwala, M.M. and J.A. Vita, *Grapes and cardiovascular disease.* J Nutr, 2009. 139(9): p. 1788S-93S.
71. Giuseppe Lippi, M.F., Gian Cesare Guidi, *Red wine and cardiovascular health: the "French Paradox" revisited.* International Journal of Wine Research 2010.
72. Das, D.K., S. Mukherjee, and D. Ray, *Erratum to: resveratrol and red wine, healthy heart and longevity.* Heart Fail Rev, 2011. 16(4): p. 425-35.
73. Ruf, J.C., *Alcohol, wine and platelet function.* Biol Res, 2004. 37(2): p. 209-15.
74. Fragopoulou, E., et al., *Biological activity of total lipids from red and white wine/must.* J Agric Food Chem, 2001. 49(11): p. 5186-93.
75. Bianchini, F. and H. Vainio, *Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?* Eur J Cancer Prev, 2003. 12(5): p. 417-25.
76. Dong, Z., *Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol.* Mutat Res, 2003. 523-524: p. 145-50.
77. Zhu, W., *Trans-Resveratrol Alters Mammary Promoter Hypermethylation in Women at Increased Risk for Breast Cancer.* Nutr Cancer 2012(64): p. 393-400.
78. Raffaele Napoli, D.C., *Red wine consumption improves insulin resistance but not endothelial function in type 2 diabetic patients.* Metabolism - Clinical and Experimental, 2005. 54(3): p. 306-313.
79. Chiva-Blanch, G., et al., *Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial.* Clin Nutr, 2013. 32(2): p. 200-6.
80. Schoonen, W.M., et al., *Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men.* Int J Cancer, 2005. 113(1): p. 133-40.
81. Schuurman, A.G., R.A. Goldbohm, and P.A. van den Brandt, *A prospective cohort study on consumption of alcoholic beverages in relation to prostate cancer incidence (The Netherlands).* Cancer Causes Control, 1999. 10(6): p. 597-605.
82. Velicer CM, K.A., White E, *Alcohol use and the risk of prostate cancer: Results from the VITAL cohort study.* Nutr Cancer 2006. 56(1): p. 6-50.
83. Sutcliffe, S., et al., *A prospective cohort study of red wine consumption and risk of prostate cancer.* Int J Cancer, 2007. 120(7): p. 1529-35.
84. Grønbaek, K.A.a.M., *Does Amount or Type of Alcohol Influence the Risk of Prostate Cancer?* . The Prostate, 2002. 52: p. 297-304.
85. Sesso, H.D., R.S. Paffenbarger, Jr., and I.M. Lee, *Alcohol consumption and risk of prostate cancer: The Harvard Alumni Health Study.* Int J Epidemiol, 2001. 30(4): p. 749-55.
86. Chao, C., et al., *Red wine consumption and risk of prostate cancer: the California men's health study.* Int J Cancer, 2010. 126(1): p. 171-9.

87. Yadav, M., et al., *Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review*. Nutr Res Rev, 2010. 23(2): p. 184-90.
88. Xanthopoulou MN, N.T., Fragopoulou E, Antonopoulou S, *Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts*. Food Res Int 2009. 42.
89. Xia, T. and Q. Wang, *Antihyperglycemic effect of Cucurbita ficifolia fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats*. Fitoterapia, 2006. 77(7-8): p. 530-3.
90. Hong, H., C.S. Kim, and S. Maeng, *Effects of pumpkin seed oil and saw palmetto oil in Korean men with symptomatic benign prostatic hyperplasia*. Nutr Res Pract, 2009. 3(4): p. 323-7.
91. Fruhwirth, G.O., & Hermetter, A, *Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities*. European Journal Lipid Science and Technology, 2007. 109: p. 1128-1140.
92. Caili, F., Huan, S., & Quanhong, L. , *A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin*. Plant Foods for Human Nutrition, 2006. 61: p. 73-80.
93. Klippel, K.F., D.M. Hiltl, and B. Schipp, *A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia*. German BPH-Phyto Study group. Br J Urol, 1997. 80(3): p. 427-32.
94. Faloon, S.B.S.M.a.W., *Beta-Sitosterol and the Aging Prostate Gland*. Life extension Foundation, 2008.
95. Angel L. Ortega, S.M.a.J.M.E., *Glutathione in Cancer Cell Death Review*. Cancers 2011. 3: p. 1285-1310.
96. Wu, G., et al., *Glutathione metabolism and its implications for health*. J Nutr, 2004. 134(3): p. 489-92.
97. Li, S., et al., *The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase*. Cancer Res, 2000. 60(14): p. 3927-39.
98. Simona Jurkovič, J.O., Janja Marc, *Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes*. Biochemia Medica 2008. 18(2): p. 16274.
99. Arthur, J.R., *The glutathione peroxidases*. Cell Mol Life Sci, 2000. 57(13-14): p. 1825-35.
100. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2011. 15(7): p. 1957-97.
101. Khan, T., Zhang and Chen *Antioxidant enzymes and cancer*. Chin. J. Cancer Res. , 2010. 22: p. 87-92.
102. Huang, Y., et al., *Transforming growth factor-beta1 induces glutathione peroxidase-1 and protects from H2O2-induced cell death in colon cancer cells via the Smad2/ERK1/2/HIF-1alpha pathway*. Int J Mol Med, 2012. 29(5): p. 906-12.
103. Arsova-Sarafinovska, Z., et al., *Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer*. Clin Biochem, 2009. 42(12): p. 1228-35.
104. Aydin, A., et al., *Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Clin Biochem, 2006. 39(2): p. 176-9.

105. Xanthopoulou MN, F.E., Kalathara K, Nomikos T, Karantonis HC, Antonopoulou S, *Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts*. Chem, 2010. 120(3): p. 665-672.
106. Ghiselli, A., et al., *Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine*. J Agric Food Chem, 1998. 46(2): p. 361-367.
107. Yiannakopoulou, E., *Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications*. Archives of Hellenic Medicine, 2009. 26(1): p. 23-35.
108. Karantzaa, L.a.V., *Autophagy and cancer cell metabolism review*. Seminars in Cell & Developmental Biology 2012. 23: p. 395– 401.
109. Ryan, E.Y.L.a.K.M., *Autophagy and cancer – issues we need to digest*. Journal of Cell Science 2012. 125: p. 2349-2358.
110. Klionsky, U.N.a.D.J., *Molecular mechanisms and regulation of specific and non specific autophagy pathways in yeast*. JBC 2005. 280(51): p. 41785-41788.
111. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. 306(5698): p. 990-5.
112. Dawson, T.M.a.D., V.L. , *Nitric oxide: Actions and pathological roles*. The Neuroscientist 1995. 1: p. 7-18.
113. Griess, P., *Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen*. Chem., 1879. 12.
114. André Quincozes-Santos, L.D.B., [...], and Carmem Gottfried (2013) *Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1*.
115. Asaduzzaman Khan, H.-c.C., Xin-xing Wan, Mousumi Tania, Ai-hua Xu, Fang-zhi Chen, and Dian-zheng Zhang, *Regulatory Effects of Resveratrol on Antioxidant Enzymes: a Mechanism of Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Cancer Cells*. Mol. Cells 2013. 35: p. 219-225.
116. Wagner, B.A., et al., *Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells*. Arch Biochem Biophys, 2005. 440(2): p. 181-90.
117. Binod Kumar, S.K., Lakshmipathi Khandrika, Randall B. Meacham, and Hari K. Koul, *Oxidative Stress Is Inherent in Prostate Cancer Cells and Is Required for Aggressive Phenotype*. Cancer Res, 2008. 68: p. 1777.
118. Kariya, S., et al., *Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. 75(2): p. 449-54.
119. Zhao, M., et al., *Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis*. Eur J Biochem, 2003. 270(18): p. 3778-86.
120. Fabiani, R., et al., *Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide*. Eur J Nutr, 2012. 51(4): p. 455-64.
121. Zhu, B., et al., *Cross-talk of alpha tocopherol-associated protein and JNK controls the oxidative stress-induced apoptosis in prostate cancer cells*. Int J Cancer, 2013. 132(10): p. 2270-82.
122. Jung, K., et al., *Antioxidant enzymes in malignant prostate cell lines and in primary cultured prostatic cells*. Free Radic Biol Med, 1997. 23(1): p. 127-33.
123. Pintea, A., et al., *Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells*. J Ocul Pharmacol Ther, 2011. 27(4): p. 315-21.

124. Spanier, G., et al., *Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4)*. J Physiol Pharmacol, 2009. 60 Suppl 4: p. 111-6.
125. Diaz-Flores, M., et al., *Effect of an aqueous extract of Cucurbita ficifolia Bouche on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes*. J Ethnopharmacol, 2012. 144(1): p. 101-8.
126. Zuhair, H.A., A.A. Abd El-Fattah, and M.I. El-Sayed, *Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats*. Pharmacol Res, 2000. 41(5): p. 555-63.
127. Gladyshev, V.N., et al., *Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 251(2): p. 488-93.
128. Dong-Yun Ouyang, L.-H.X., [...], and Shuai Ren, *Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5*. Autophagy, 2013. 1(9): p. 20-32.
129. Prabhu, V., et al., *Resveratrol depletes mitochondrial DNA and inhibition of autophagy enhances resveratrol-induced caspase activation*. Mitochondrion, 2012.
130. Hannigan, A.M. and S.M. Gorski, *Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet?* Autophagy, 2009. 5(2): p. 140-51.
131. Li, J., Z. Qin, and Z. Liang, *The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells*. BMC Cancer, 2009. 9: p. 215.
132. Miki, H., et al., *Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells*. Int J Oncol, 2012. 40(4): p. 1020-8.
133. Lin, C.J., et al., *Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy*. Free Radic Biol Med, 2012. 52(2): p. 377-91.
134. Dong Xiao, V.V.a.S.V.S., *Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak*. Mol Cancer Ther 2006. 5: p. 2931.