



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Διερεύνηση της επίδρασης εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων σε
καρκινικά κύτταρα**

ΤΡΙΜΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΜ 4421201

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΤΕΝΤΑ ΡΩΞΑΝΗ (επιβλέπουσα)

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ

Αθήνα 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, κυρία Τέντα Ρωξάνη, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την βοήθεια και καθοδήγησή της στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή Φαρμακογνωσίας, κύριο Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακογνωσίας, κύριο Νεκτάριο Αληγιάννη, της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, για την απομόνωση και ταυτοποίηση των εκχυλισμάτων.

Ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, Ιωάννη και Ευδοκία, καθώς και τον αδελφό μου Διονύση, που με στήριζαν ακόμα μια φορά στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Ευχαριστώ επίσης τους συγγενείς και φίλους για την αγάπη τους και την ενθαρρυντική συμπεριφορά τους, ιδιαίτερα τα δύο τελευταία χρόνια.

Σας ευχαριστώ πολύ όλους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Το σκελετικό σύστημα	8
1.2 Σύσταση του οστίτη ιστού	10
1.2.1 Οργανικό μέρος	10
1.2.1.1 Οστικά κύτταρα	10
1.2.1.2 Ινίδια κολλαγόνου	13
1.2.1.3 Θεμέλια ουσία	14
1.2.2 Ανόργανο μέρος	15
1.3 Δομή	15
1.4 Ανακατασκευή των οστών	17
1.4.1 Αναδιαμόρφωση του οστού και οι φάσεις επιτέλεσής της	17
1.4.2 Ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής	20
1.5 Οστικές παθήσεις	27
1.5.1 Οστεοσάρκωμα	28
1.5.1.1 Παθοφυσιολογία του οστεοσαρκώματος	28
1.5.1.2 Ανάπτυξη, κλινική πορεία και αντιμετώπιση του οστεοσαρκώματος	34
1.6 Αυτοφαγία	39
1.6.1 Τι είναι η αυτοφαγία	39
1.6.2 Μορφές αυτοφαγίας	42
1.6.3 Λειτουργίες της αυτοφαγίας	45
1.6.4 Στάδια της αυτοφαγίας-σχηματισμός αυτοφαγικών κυστιδίων	47

1.6.5 Τα γονίδια της αυτοφαγίας	49
1.6.5.1 Atg12-Atg5-Atg16L	51
1.6.5.2 LC3-II-PE	51
1.6.5.3 Το σύμπλοκο ULK	55
1.6.5.4 Beclin 1	56
1.6.6 Ρύθμιση της αυτοφαγίας	58
1.6.6.1 mTOR	59
1.6.6.2 Η πορεία της φωσφοϊνοσιτόλης	63
1.6.7 Αυτοφαγία και αυτοφαγικοί δείκτες	64
1.6.7.1 p62/SQTM1	64
1.6.7.2 NBR1	74
1.6.8 Η αυτοφαγία στην επιβίωση και στο θάνατο των κυττάρων	78
1.6.9 Η αυτοφαγία στη νόσο	80
1.6.9.1 Καρκίνος	80
1.6.9.2 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες	81
1.6.9.3 Λοιμώδη νοσήματα	83
1.6.9.4 Καρδιοαγγειακά νοσήματα	83
1.6.9.5 Μεταβολικά νοσήματα	84
1.6.9.6 Νοσήματα θώρακος	84
1.6.9.7 Γήρας	85
1.7 Ιδιότητες φυτών	86
1.7.1 <i>Salvia fruticosa</i>	86
1.7.2 <i>Crocus sativus</i>	89
1.7.3 <i>Pinus nigra</i>	97
1.7.4 <i>Iris unguicularis</i>	99
1.7.5 <i>Cotinus coggygria</i>	102
1.7.6 <i>Pisum sativum</i>	104

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	107
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	108
3.1 Φυτικά εκχυλίσματα	108
3.2 Κυτταροκαλλιέργειες	108
3.2.1 Κυτταρική σειρά MG-63	108
3.3 Μελέτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού	110
3.3.1 Μέτρηση κυττάρων με τη μέθοδο MTT	110
3.4 Προσδιορισμός πρωτεϊνών (Bradford assay)	111
3.5 ELISA για την ανίχνευση αυτοφαγικών δεικτών	113
3.6 Στατιστική ανάλυση	114
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
4.1 Αποτελέσματα μέτρησης κυτταρικού πολλαπλασιασμού	115
4.2 Αποτελέσματα μέτρησης αυτοφαγικών δεικτών	123
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο καρκίνος είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας και αιτία θνησιμότητας που αυξάνει ετησίως. Το οστεοσάρκωμα είναι ο πιο κοινός πρωτογενής κακοήθης όγκος του μεσεγχυματικού ιστού του οστού στους ανθρώπους, ιδιαίτερα σε παιδιά και εφήβους. Βιβλιογραφικές αναφορές σε πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες, προτείνουν τη χρήση φυτικών προϊόντων, όπως φρούτα, λαχανικά και σπόρους, ως έναν νέο σχετικά τρόπο πρόληψης του καρκίνου αλλά και ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική η οποία καταστέλλει, καθυστερεί, αντιστρέφει ή επιβραδύνει την διαδικασία καρκινογένεσης. Αυτό το είδος θεραπείας είναι γνωστό ως χημειοπροφύλαξη.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης, ως προς την πιθανή χημειοπροστατευτική δράση τους, σε καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος, MG-63.

Μεθοδολογία: Στα καρκινικά κύτταρα MG-63 χορηγήθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα των *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Pisum sativum*, *Salvia fruticosa* και *Iris unguicularis* και αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με την μέθοδο MTT. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αυτοφαγικής δραστηριότητας των καρκινικών κυττάρων MG-63, μέσω ποσοτικής εκτίμησης των αυτοφαγικών δεικτών p62 και NBR1, μετά την επίδραση των εκχυλισμάτων, με την μέθοδο ELISA.

Αποτελέσματα: Τα φυτικά εκχυλίσματα των *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Salvia fruticosa* και *Iris unguicularis*, ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, μέχρι την χορηγούμενη συγκέντρωση των 250 $\mu\text{g/mL}$, ενώ το εκχύλισμα του φυτού *Pisum sativum*, δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ως προς την βιωσιμότητα τους. Τα πειράματα της έκφρασης των πρωτεϊνών p62 και NBR1 κατέδειξαν ότι, τα εκχυλίσματα των *Cotinus coggygria*, *Pinus nigra* και *Crocus sativus*, προκαλούν αναστολή της αυτοφαγικής ροής στα καρκινικά κύτταρα MG-63, ενώ τα εκχυλίσματα *Salvia fruticosa* και *Iris unguicularis* την επάγουν.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα φυτικά εκχυλίσματα *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Salvia fruticosa* και *Iris unguicularis* επιδρούν τόσο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων MG-63, όσο και στον αυτοφαγικό μηχανισμό τους και θα μπορούσαν να ενσωματωθούν επικουρικά στα θεραπευτικά σχήματα χημειοπροστασίας ή/και στα θεραπευτικά σχήματα των μεταβολικών νοσημάτων των οστών.

Λέξεις κλειδιά: φυτικά εκχυλίσματα, καρκινικά κύτταρα MG-63, αυτοφαγία.

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a major health problem and cause of mortality which grows annually. Osteosarcoma is the commonest primary malignant tumor of the mesenchymal bone tissue in humans, especially in children and teenagers. Bibliographic sources in experimental and epidemiological studies suggest the use of natural products, such as fruit, vegetables and seeds, as a relatively new means of preventing cancer and as a promising strategy which suppresses, delays, reverses or decelerates the process of carcinogenesis. This kind of treatment is known as chemoprevention.

Purpose: The purpose of the present study was the evaluation of extracts of natural origin in terms of their potential chemoprotective action against MG-63 osteosarcoma cells.

Methodology: Plant extracts of *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Pisum sativum*, *Salvia fruticosa* and *Iris unguicularis* were administered to MG-63 tumor cells and their effect in terms of cell proliferation, was evaluated with the MTT method. Moreover, the autophagic activity of these extracts was measured by the ELISA method, through quantitative estimation of the p62 and NBR1 autophagy markers in MG-63 tumor cells.

Results: The plant extracts of *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Salvia fruticosa* and *Iris unguicularis* inhibit the proliferation of cancer cells in a dose-dependent manner (7-250 mg/mL), whereas the plant extract of *Pisum sativum* had no statistically significant effect in terms of cell viability. Furthermore, the extracts of *Cotinus coggygria*, *Pinus nigra* and *Crocus sativus* cause inhibition of the autophagic influx in MG-63 tumor cells, whereas the extracts of *Salvia fruticosa* and *Iris unguicularis* induce autophagy, as it is shown by the evaluation of p62 and NBR1 protein levels.

Conclusions: The results indicate that the plant extracts of *Crocus sativus*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Salvia fruticosa* and *Iris unguicularis* have an effect on both the proliferation of the MG-63 tumor cells and their autophagic mechanism and that they may be used as adjuvant factors in treatment regimens of chemoprotection and/or in bone metabolic diseases.

Keywords: *plant extracts, MG-63 tumor cells, autophagy.*

Οι παραπάνω λειτουργίες γίνονται εφικτές λόγω της ακαμψίας και αντοχής του οστού, ενώ αυτές που ακολουθούν λόγω των μεταβολικών του ιδιοτήτων.

- Αποτελεί έναν μεταβολικό αποθηκευτικό χώρο ιόντων, κυρίως ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, νατρίου, συμβάλλοντας στη συντήρηση της ομοιόστασης και της οξεοβασικής ισορροπίας.
- Παράγει ερυθροκύτταρα.
- Λειτουργεί ως δεξαμενή αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. (Cecil, 2000; Gray, 2000; Andreoli et al., 2000; Taichman, 2005).

1.2 Σύσταση του οστίτη ιστού

Τα οστά αποτελούνται από οργανικό και ανόργανο μέρος. Το οργανικό μέρος είναι το 35% περίπου και το 65% είναι τα ανόργανα συστατικά (Green & Kleeman, 1991).

1.2.1 Οργανικό Μέρος

Το οργανικό τμήμα του οστίτη ιστού περιλαμβάνει :

- Οστικά Κύτταρα
- Ινίδια κολλαγόνου
- Θεμέλια ουσία

Τα ινίδια κολλαγόνου και η θεμέλια ουσία συνιστούν τη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού.

1.2.1.1 Οστικά Κύτταρα

Τα οστά περιέχουν τουλάχιστον τρεις εξειδικευμένους τύπους κυττάρων, απαραίτητους για τη σύνθεση, διάπλαση και ανάπλαση του εκτεταμένου εξωκυττάριου οστίτη ιστού, συγκεκριμένα τους οστεοβλάστες, που προωθούν τον οστικό σχηματισμό, τους οστεοκλάστες, που προωθούν την οστική απορρόφηση και βρίσκονται στις επιφάνειες αύξησης του οστού και

