

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη συνδυασμού τεχνικών για την *in vitro* εκτίμηση της βιολογικής δραστηριότητας του Εξαιρετικά παρθένου Ελαιόλαδου (Extra-Virgin Olive Oil, EVOO), ώστε να γίνει καταλληλότερη προσέγγιση της *in vivo* δραστηριότητας. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (DLD-1) αλλά και σε φυσιολογικά κύτταρα HUVEC τα οποία απομονώνονται από φλέβα ομφάλιου λώρου.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του κ. Φώτση, στο ΙΤΕ-Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας/Τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών από την ερευνητική του ομάδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα βασικά συστατικά της Μεσογειακής Διατροφής είναι το Έξτρα-Παρθένο Ελαιόλαδο (Extra-Virgin Olive Oil, EVOO), το οποίο περιέχει φαινολικές ενώσεις που σχετίζονται με τις ευεργετικές ιδιότητες του EVOO (Garcia-Martinez *et al.*, 2018; Serra-Majem *et al.*, 2019). Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν πως EVOO πλούσια σε φαινολικά έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες και αντικαρκινική δράση (Bartolí *et al.*, 2000; Calza *et al.*, 2001; Levi *et al.*, 1999; Schwingshackl *et al.*, 2018).

Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες φαινολικές ουσίες απομονωμένες από το EVOO. Καθώς θέλαμε να εξάγουμε μια πιο άμεση συσχέτιση μεταξύ του EVOO και της επίδρασής του στην κυτταρική ανάπτυξη, επώασαμε κύτταρα απευθείας με EVOO. Καταλήξαμε στο ότι θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με EVOO αλλά και η απευθείας προσθήκη στα κύτταρα, αναστέλλει ειδικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων χωρίς να αναστέλλει την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πρόσθετα, για πρώτη φορά αναλύθηκαν ελληνικά μονοποικιλιακά EVOO με γνωστή την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις, κάτι που μας δίνει την δυνατότητα να διερευνήσουμε εάν η δράση τους στην κυτταρική ανάπτυξη οφείλεται σε γνωστές φαινολικές ενώσεις ή όχι. Τέλος η επίδραση των ελαιολάδων ήταν ειδική στα καρκινικά κύτταρα καθώς η ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν επηρεάστηκε μετά από επώαση με διάφορα ελαιόλαδα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταρικές καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων DLD-1 (αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου) χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με ορό 10% παρουσία αντιβιοτικού 100U/mL Penicillin και 100mg/mL Streptomycin. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε ποσοστό CO₂ 5%.

Τα κύτταρα HUVEC (ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με 20% ορό, 0.05mg/ml ECGS, 5U/ml ηπαρίνη παρουσία αντιβιοτικού 100U/mL Penicillin και 100mg/mL Streptomycin και σε τρυβλία καλλιέργειας επιστρωμένα με κολλαγόνο.

IncuCyte

Το IncuCyte είναι ένα σύστημα μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου και χρησιμοποιείται για τη μελέτη βασικών κυτταρικών αποκρίσεων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, η απόπτωση, κ.α.. Οι εικόνες για τα συγκεκριμένα πειράματα λήφθηκαν με την χρήση φακού 10X ανά 2-4 ώρες.

Δοκιμασία κυτταρικής ανάπτυξης

Σε τρυβλίο καλλιέργειας 96 φρεατίων επιστρώθηκαν 10000 κύτταρα/φρεάτιο από την προηγούμενη μέρα του πειράματος. Το EVOO προστέθηκε στα κύτταρα με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος αφορά ένα πρωτόκολλο σύντομης εκχύλισης σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας απουσία ορού. Εν συντομία, EVOO προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο σε αναλογία 1:25. Μετά από ομογενοποίηση με περιδίνηση για 20 δευτερόλεπτα το μίγμα αφέθηκε να ηρεμήσει για 5 λεπτά. Μετά τον εμπλουτισμό του μέσου με τις φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν στο EVOO, αυτό το μέσο χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια αυτών των δύο κυτταρικών σειρών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η δεύτερη διαδικασία που χρησιμοποιήσαμε είναι η κατεργασία κυττάρων απευθείας με χρήση EVOO σε 4% ο/ο (v/v). Συγκεκριμένα, προσθέτουμε EVOO στην ίδια αναλογία (1:25) καθώς προετοιμάζουμε το εμπλουτισμένο μέσο καλλιέργειας κυττάρων.

Number of EVOO	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
EVOO	Corn Oil - No phenolics	Control Oil - No phenolics								
Variety	-	-	KORONEIKI	KORONEIKI	PIKOUAL	KORONEIKI	MANAKI	LIANOLIA-KORONEIKI	DOPIA ZAKYNTHOU	
Oleocanthal	-	-	232	318	180	180	290	217	302	376
Oleacein	-	-	231	322	132	89	107	197	267	348
Oleocanthal + Oleacein (index D1)	-	-	464	640	312	269	397	415	569	723
Listroside aglycon (monoaldehyde form)	-	-	93	83	74	69	32	132	55	58
Oleuropein aglycon (monoaldehyde form)	-	-	121	119	97	87	29	204	73	73
Listroside aglycon (dialdehyde form)	-	-	228	409	239	135	123	370	237	153
Oleuropein aglycon (dialdehyde form)	-	-	168	336	148	80	51	236	190	119
Total tyrosol derivatives	-	-	553	811	493	384	445	719	594	587
Total hydroxytyrosol derivatives	-	-	520	777	378	257	186	637	530	539
Total polyphenols analyzed	-	-	1073	1587	871	641	632	1357	1124	1126

Number of EVOO	22	23	24	25	26	27	28	29
EVOO								
Variety	KORONEIKI	MANAKI-KATSOULIERA		Chalkidikis	Lianolia-Koroneiki	Tsounati	Kalamon	Koroneiki-kypriaki
Oleocanthal	232	232		295	262	264	882	455
Oleacein	204	105		204	182	221	310	107
Oleocanthal + Oleacein (index D1)	436	337		499	444	485	1191	561
Listroside aglycon (monoaldehyde form)	65	37		83	83	179	37	25
Oleuropein aglycon (monoaldehyde form)	107	34		109	92	255	29	19
Listroside aglycon (dialdehyde form)	307	107		195	225	667	72	<5
Oleuropein aglycon (dialdehyde form)	224	48		95	148	370	51	<5
Total tyrosol derivatives	604	376		573	571	1110	990	480
Total hydroxytyrosol derivatives	535	187		408	422	846	390	126
Total polyphenols analyzed	1138	536		981	993	1956	1380	606

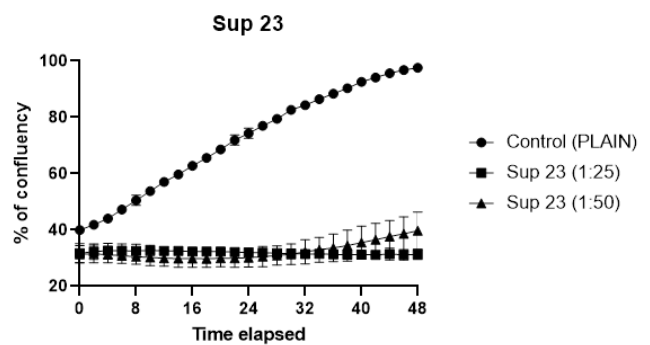
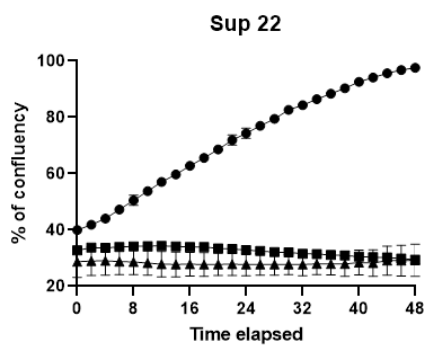
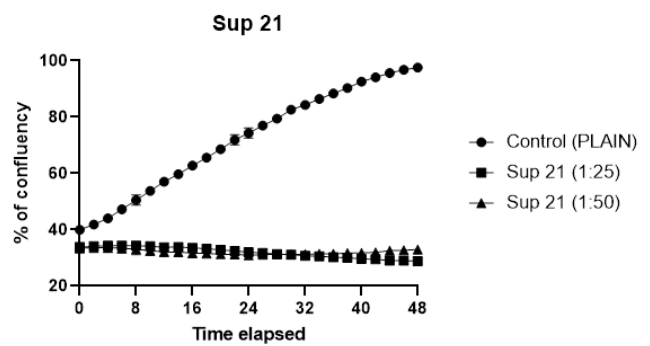
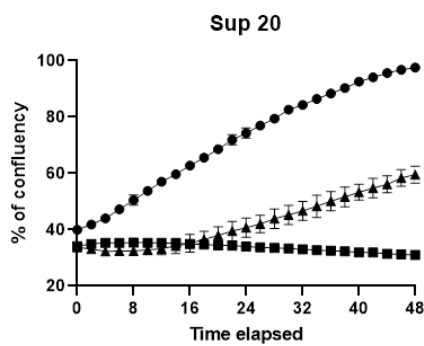
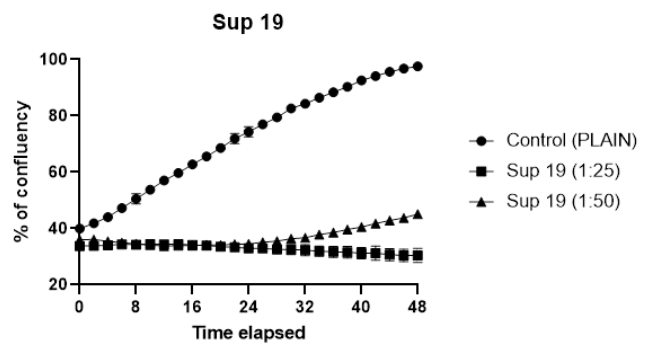
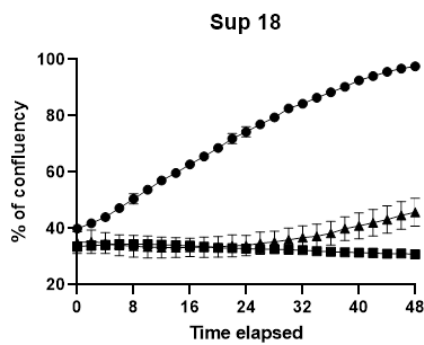
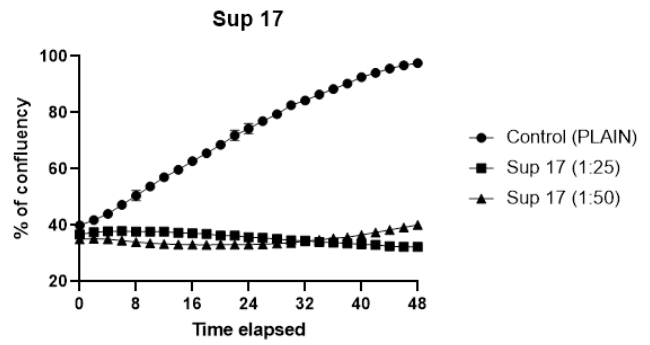
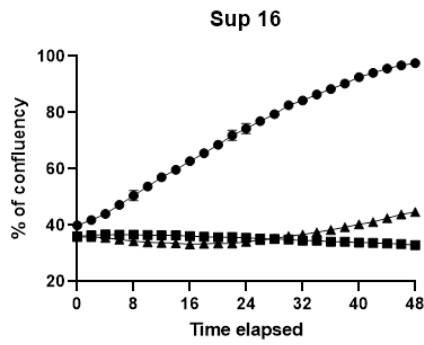
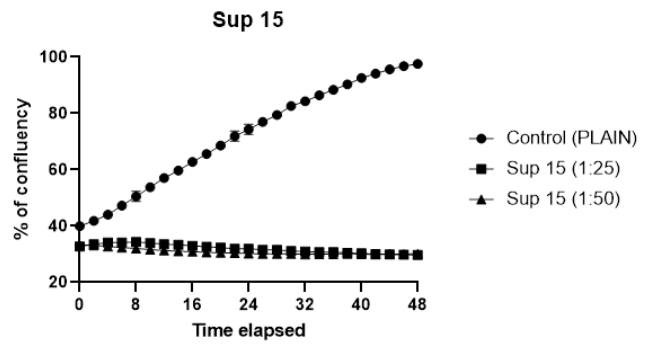
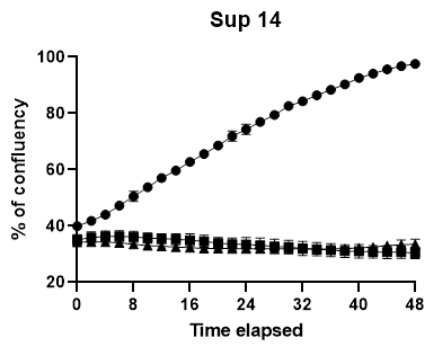
Πίνακας 1: Χημική ανάλυση των EVOO για την ταυτοποίηση και περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν

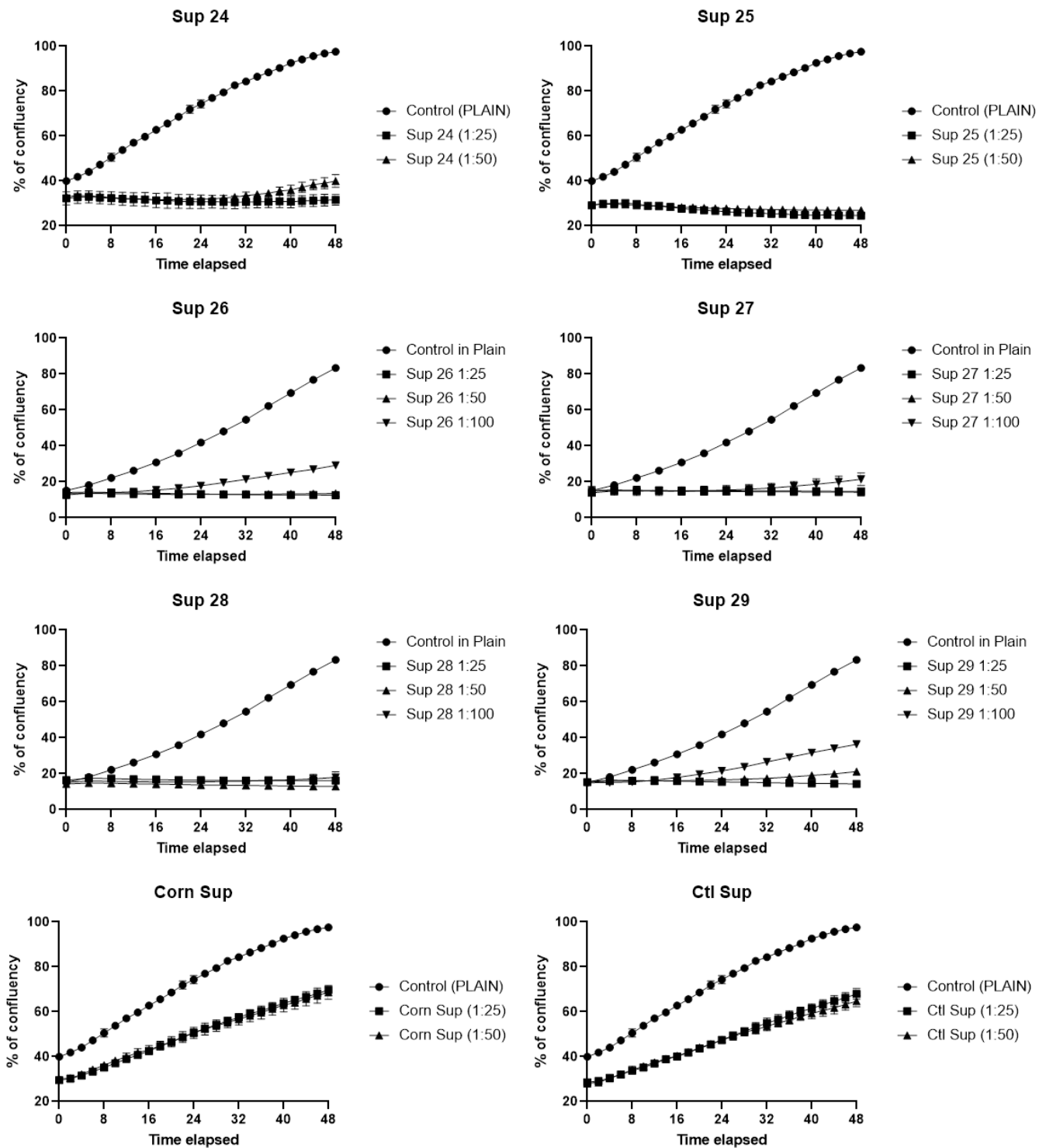
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την μελέτη της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων έγινε επώαση (άμεση ή έμμεση) με EVOO και λήψη στιγμιότυπων κάθε 4 ώρες με το σύστημα IncuCyte. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1 & Εικόνα 2.

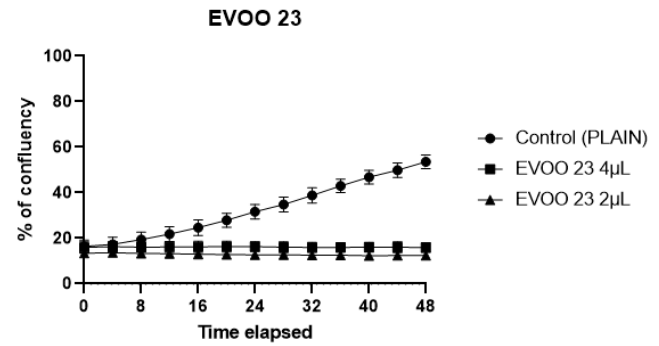
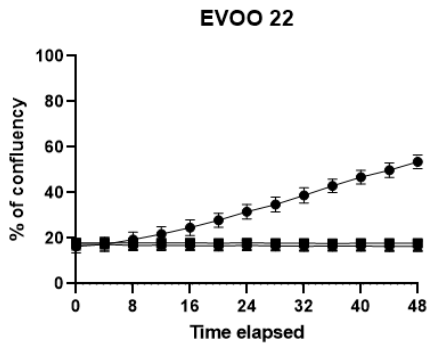
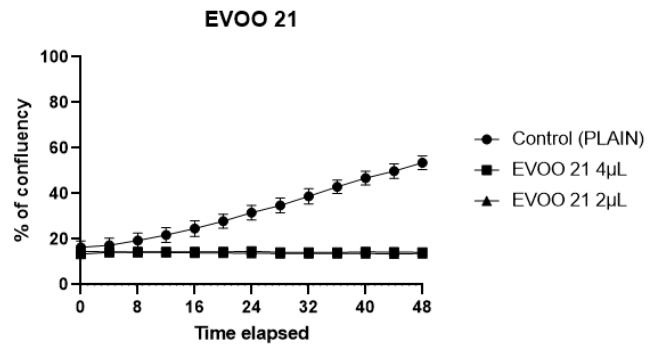
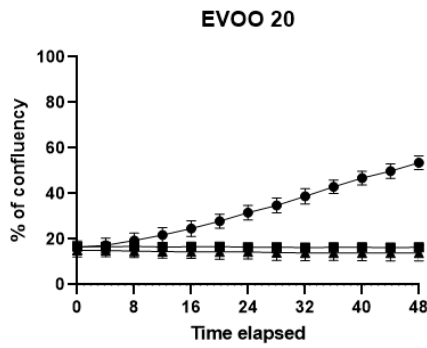
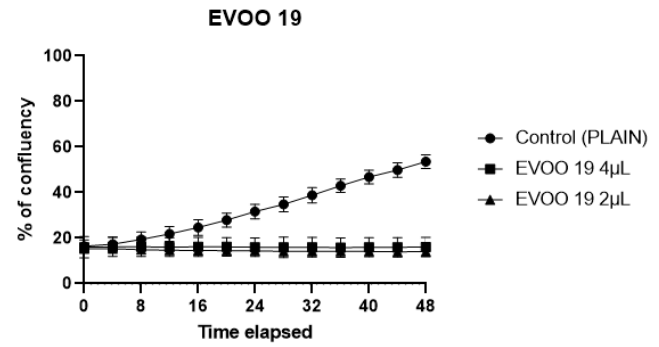
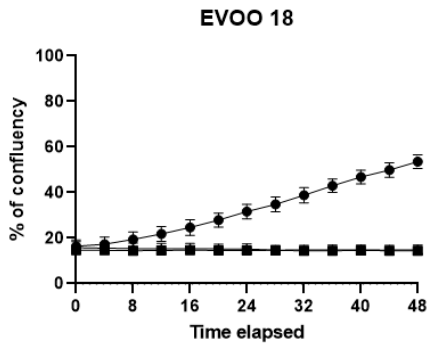
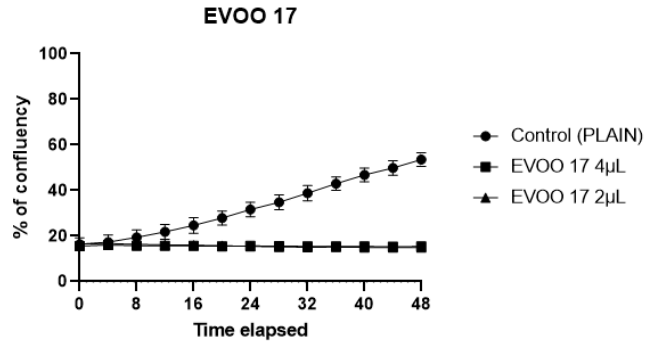
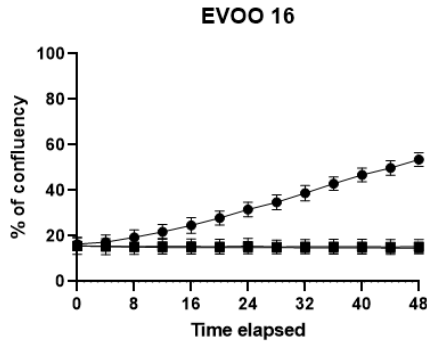
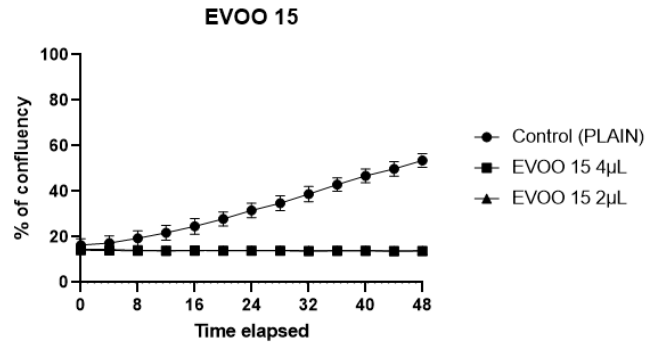
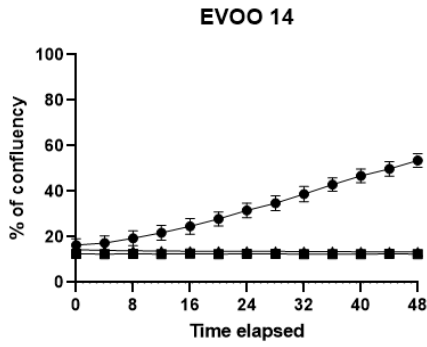
Έπειτα από παρατήρηση των αποτελεσμάτων της Εικόνας 1, η επώαση καρκινικών κυττάρων DLD-1 με EVOO με την χρήση ενός πρωτόκολλου γρήγορης εκχύλισης σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, οδήγησε σε σημαντική αναστολή της κυτταρικής αύξησης στην μικρότερη αραιώση (1:25). Στην αραιώση 1:50, μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το EVOO20 παρατηρήθηκε μικρότερη αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Επίσης, με την χρήση της μεγαλύτερης αραιώσης (1:100), μόνο στα EVOO 26 και 29 παρατηρήθηκε μικρότερη αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Εικόνα 1).

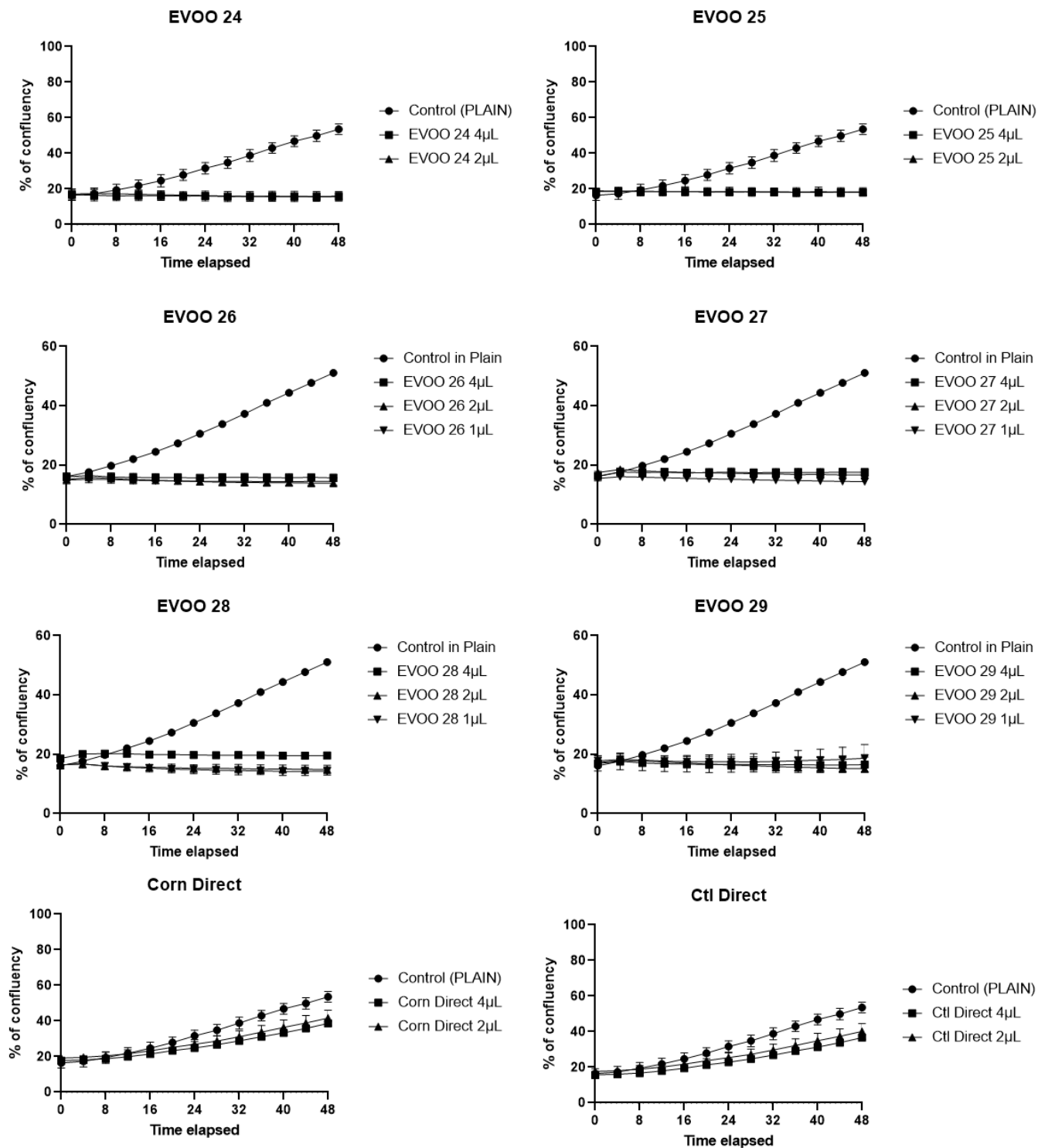
Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της Εικόνας 1 συγκριτικά με αυτά της Εικόνας 2, είναι εμφανές ότι η ανασταλτική δράση του EVOO στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων DLD1 είναι η μέγιστη δυνατή στην άμεση χορήγηση όλων των EVOO (Εικόνα 2).





Εικόνα 1: Τα EVOO χορηγήθηκαν σε DLD1 κύτταρα με τη μέθοδο της γρήγορης εκχύλισης των φαινολικών ουσιών σε υλικό καλλιέργειας σε 3 διαφορετικές αναλογίες EVOO:Θρεπτικού μέσου (1:25, 1:50, 1:100). Η απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων έγινε με το IncuCyte για 48 ώρες.





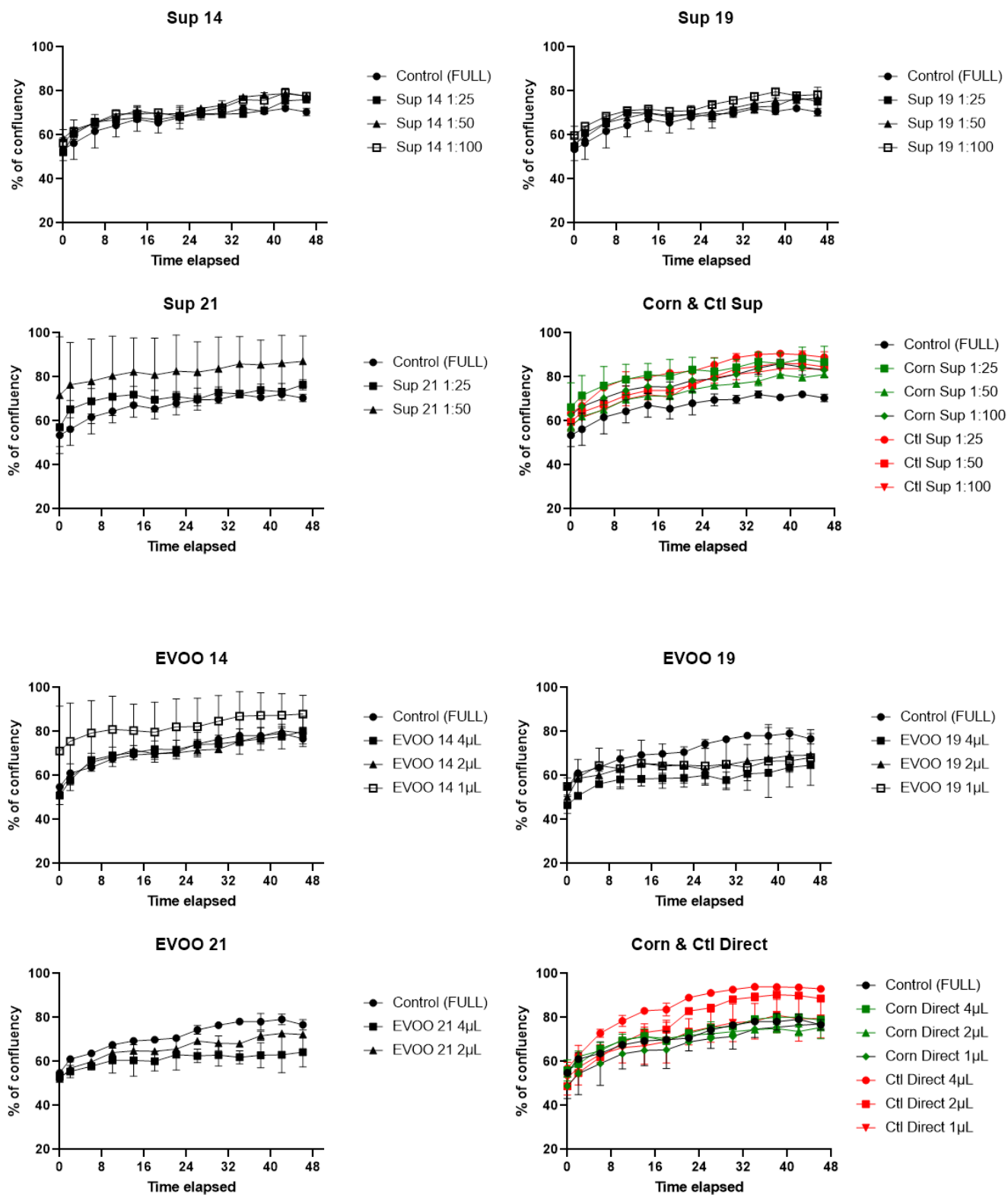
Εικόνα 2: Τα EVOO χορηγήθηκαν άμεσα στο υλικό καλλιέργειας DLD1 κυττάρων. Η απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων έγινε με το IncuCyte για 48 ώρες.

Εκτός από την επίδραση στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ελέγχθηκε η επίδραση τριών ΕVΟΟ σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα ΗUVEC. Κύτταρα ΗUVEC που επώαστηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο παρουσία 3 διαφορετικών ΕVΟΟ δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην κυτταρική αύξηση. Αντίθετα, παρατηρήθηκε η διατήρηση της κυτταρικής αύξησης όπως παρατηρήθηκε σε κύτταρα που δεν επώαστηκαν παρουσία ΕVΟΟ (Εικόνα 3).

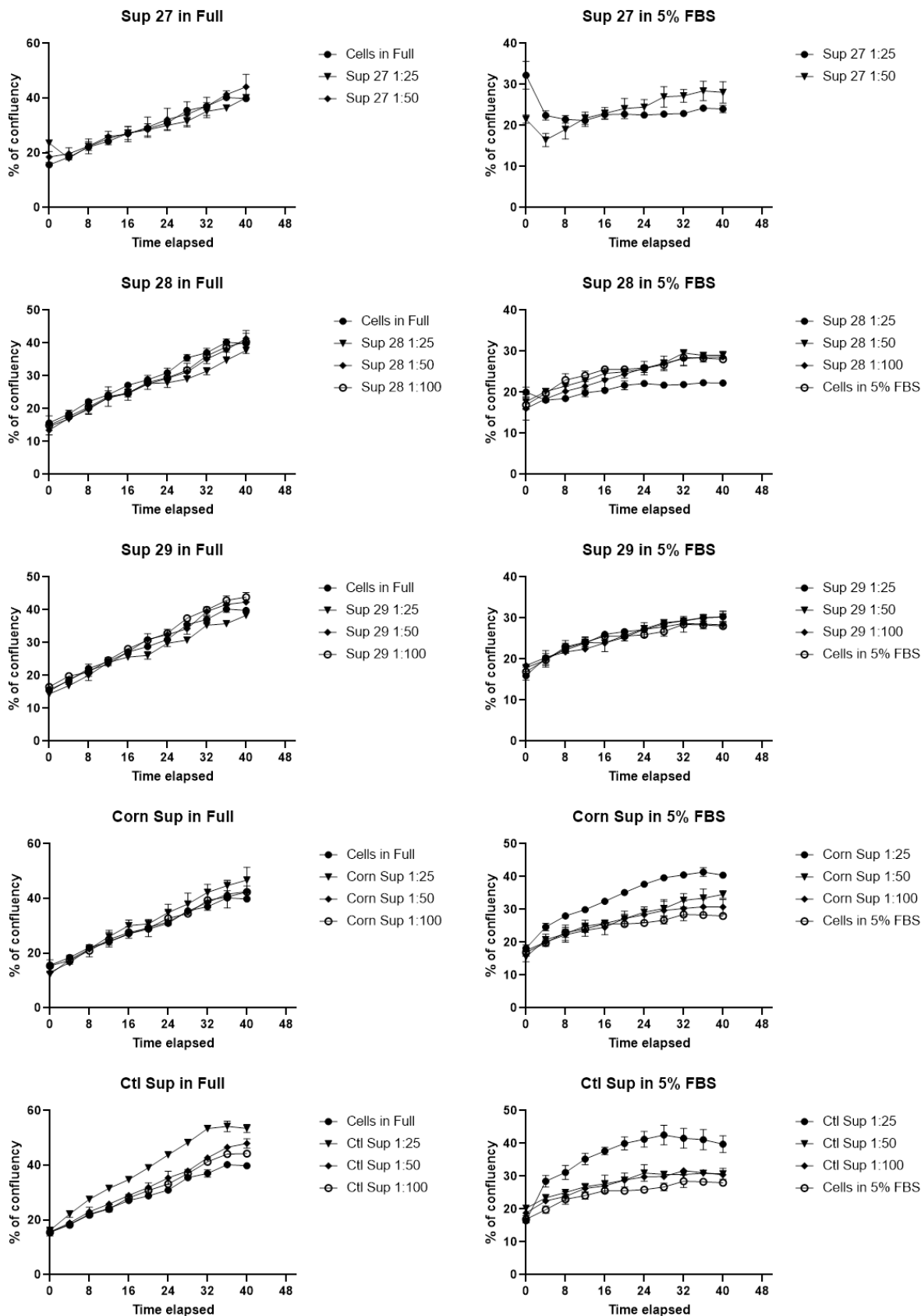
Έπειτα από επώαση των ΕVΟΟ με τη μέθοδο της γρήγορης εκχύλισης με τη χρήση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε δύο συνθήκες ορού FBS (20% & 5%), δεν παρατήρηθηκε αναστολή της κυτταρικής σε κάποια περίπτωση (Εικόνα 4).

Ομοίως, τα ίδια ευρήματα παρατηρήθηκαν και με την άμεση προσθήκη των ΕVΟΟ σε κύτταρα ΗUVE (Εικόνα 5).

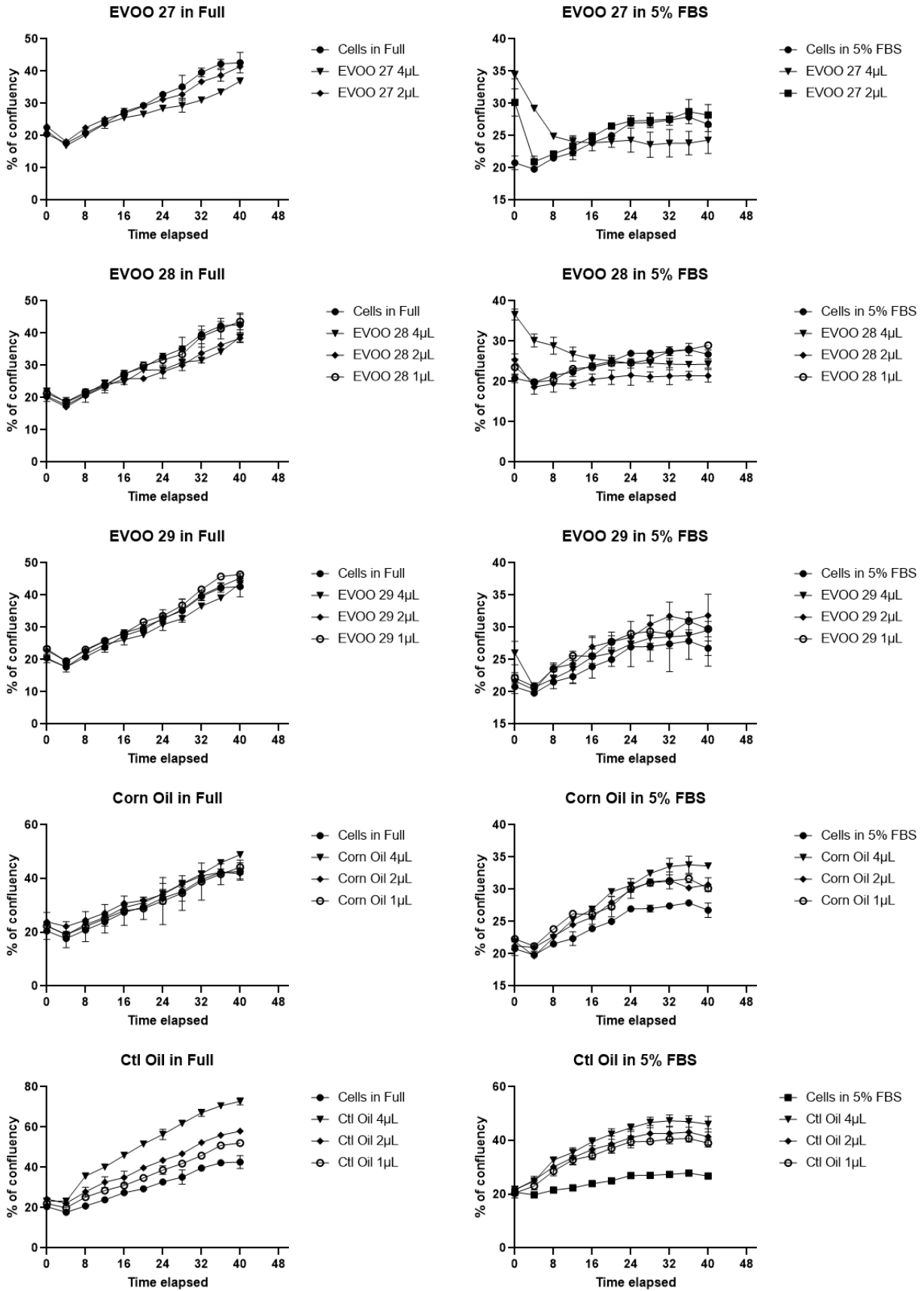
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το εμπορικά διαθέσιμο ελαιόλαδο (CtI Oil), κυρίως με την άμεση προσθήκη αυτού, οδήγησε σε αύξηση της κυτταρικής ανάπτυξης συγκριτικά με κύτταρα όπου δεν έγινε επώαση (Εικόνα 2, 3 & 4).



Εικόνα 3: Τα EVOO χορηγήθηκαν σε HUVE κύτταρα με τη μέθοδο της γρήγορης εκχύλισης των φαινολικών ουσιών σε υλικό καλλιέργειας σε 3 διαφορετικές αναλογίες EVOO:Θρεπτικού μέσου (1:25, 1:50, 1:100) ή με άμεση χορήγηση σε πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας. Η απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων έγινε με το IncuCyte για 48 ώρες.



Εικόνα 4 : Τα EVOO χορηγήθηκαν σε HUVE κύτταρα με τη μέθοδο της γρήγορης εκχύλισης των φαινολικών ουσιών σε υλικό καλλιέργειας σε 3 διαφορετικές αναλογίες EVOO:Θρεπτικού μέσου (1:25, 1:50, 1:100) σε δύο συνθήκες FBS (FULL-20% και 5%). Η απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων έγινε με το IncuCyte για 40 ώρες



Εικόνα 5: Τα EVOO χορηγήθηκαν σε HUVE κύτταρα με άμεση χορήγηση σε δύο συνθήκες FBS (FULL-20% και 5%). Η απεικόνιση των ζωντανών κυττάρων έγινε με το IncuCyte για 40 ώρες

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα, θέλοντας να μελετήσουμε την αντικαρκινική δράση των ΕVOO, επώασαμε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (DLD-1) με διαφορετικά ΕVOO χρησιμοποιώντας δύο πειραματικές προσεγγίσεις, όπως αναφέρθηκε αρχικά.

Αρχικά, στην περίπτωση που τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με φαινολικές ουσίες μετά από εκχύλιση, παρατηρήθηκε ισχυρή δράση έναντι της ανάπτυξης των DLD-1 κυττάρων, μόνο στην εκχύλιση σε αναλογία 1:25 (ΕVOO:θρεπτικό μέσο). Αντίθετα, είτε η δόση των 1:50 είτε αυτή των 1:100 ή και αμφότερες δεν είχαν ισχυρή ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του παχέος εντέρου. Αντίθετα, η απευθείας προσθήκη ΕVOO στο θρεπτικό υλικό, και στις τρεις ποσότητες (1,2 και 4 μλ) οδηγεί σε αναστολή την ανάπτυξης των κυττάρων. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το καλαμποκέλαιο και ένα ΕVOO φτωχό σε φαινολικές ενώσεις. Όπως ήταν αναμενόμενο, και τα δύο δεν οδήγησαν σε κάποιο κυτταροτατικό φαινόμενο. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι η δράση των ΕVOO ήταν ανεξάρτητη από την περιεκτικότητά τους στις γνωστές φαινολικές ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, ΕVOO εξαιρετικά πλούσια σε γνωστές φαινολικές ουσίες (ολεοκανθάλη, ολεασινη, κ.α.) είχαν παρόμοια δράση με ΕVOO λιγότερο πλούσια στις ουσίες αυτές.

Στην περίπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν αυτά επώαστηκαν με ΕVOO είτε σε συνθήκες πλήρους ορού (20%) είτε σε συνθήκες μειωμένου ορού (5%), η κυτταρική αύξηση δεν επηρεάστηκε αρνητικά, αλλά αντιθέτως διατήρησαν ένα πλατώ συγκέντρωσης. Επομένως η ανασταλτική δράση των ΕVOO στην ανάπτυξη δισδιάστατων κυτταρικών καλλιεργειών εντοπίζεται μόνο στις καρκινικές σειρές και όχι στις φυσιολογικές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bartolí R, Fernández-Bañares F, Navarro E, Castellà E, Mañé J, et al. 2000. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: Modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. *Gut*
- Calza S, Ferraroni M, LaVecchia C, Franceschi S, Decarli A. 2001. Low-risk diet for colorectal cancer in Italy. *European Journal of Cancer Prevention*
- Garcia-Martinez O, Ruiz C, Gutierrez-Ibanez A, Illescas-Montes R, Melguizo-Rodriguez L. 2018. Benefits of Olive Oil Phenolic Compounds in Disease Prevention. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 18: 333-40
- Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S. 1999. Food groups and colorectal cancer risk. *British Journal of Cancer*
- Schwingshackl L, Schwedhelm C, Hoffmann G, Knüppel S, Laure Preterre A, et al. 2018. Food groups and risk of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*
- Serra-Majem L, Román-Viñas B, Sanchez-Villegas A, Guasch-Ferré M, Corella D, La Vecchia C. 2019. Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. pp. 1-55: Elsevier Ltd