



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

**Συστηματική ανασκόπηση και σύνοψη πεδίου για τη μελέτη της
επίδρασης των χημικών ενώσεων του λυκίσκου (*Humulus lupulus*)
στους διαφόρους τύπους καρκίνου**

Γεώργιος Τσιόνκης

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπουσα
Γεωργία Μπράλιου
Επίκουρος Καθηγήτρια

Λαμία, Φεβρουάριος 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**Συστηματική ανασκόπηση και σύνοψη πεδίου για τη μελέτη της
επίδρασης των χημικών ενώσεων του λυκίσκου (*Humulus lupulus*)
στους διαφόρους τύπους καρκίνου**

Γεώργιος Τσιόνκης

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επιβλέπουσα
Γεωργία Μπράλιου
Επίκουρος Καθηγήτρια**

Λαμία, Φεβρουάριος 2023

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις ⁽¹⁾, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία:/...../20.....

Ο – Η Δηλ.

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

**Συστηματική ανασκόπηση και σύνοψη πεδίου για τη μελέτη της
επίδρασης των χημικών ενώσεων του λυκίσκου (*Humulus lupulus*)
στους διαφόρους τύπους καρκίνου**

Γεώργιος Τσιόνκης

Τριμελής Επιτροπή:

Γεωργία Μπράλιου (Επιβλέπουσα), Επίκουρος Καθηγήτρια

Παντελεήμων Μπάγκος, Καθηγητής

Παναγιώτα Κοντού, Επίκουρος καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Γεωργία Μπράλιου, Επίκουρη καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση που μου πρόσφερε καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε προκειμένου να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Οι συμβουλές τις ήταν καθοριστικής σημασίας και με οδήγησαν στο να εξελιχθώ τόσο ως επιστήμονας αλλά και ως άνθρωπος.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τους γονείς μου οι οποίοι υπήρξαν ένα σημαντικό στήριγμα για την μέχρι πρότινος ακαδημαϊκή μου πορεία.

Περιεχόμενα

Περίληψη	9
Abstract	11
Απόδοση συντομογραφιών	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή	15
1.1. Λυκίσκος	15
1.1.1 Χημική σύσταση λυκίσκου	17
1.1.2 Χρήση του λυκίσκου στην παραγωγή ζύθου	22
1.1.3. Η δράση του λυκίσκου στην παθοφυσιολογία του ανθρώπου	25
1.2. Καρκίνος	31
1.2.1 Γενικά στοιχεία	31
1.2.2. Αίτιες που μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο	32
1.2.3 Μέθοδοι αντιμετώπισης καρκίνου	34
1.3. Μέθοδοι μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας	37
1.3.1 Μέθοδος SRB.....	38
1.3.2 Μέθοδος MTT.....	40
1.3.3. Crystal Violet μέθοδος.....	43
1.3.4. Μέθοδος Neutral red uptake	45
1.3.5. Trypan blue μέθοδος.....	46
1.3.6. Μέθοδος εντοπισμού ATP.....	48
1.4. Μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50).....	49
1.5. Μετα-ανάλυση	51
1.6. Σκοπός παρούσας ερευνητικής εργασίας	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι	53
2.1. Συλλογή δεδομένων	53
2.1.1. Συστηματική ανασκόπηση	53
2.1.2. Διατύπωση ερευνητικού ερωτήματος	54
2.1.3. Προσδιορισμός κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού μελετών.....	54
2.1.4. Καθορισμός και αξιολόγηση των μελετών.....	55
2.1.5. Καταγραφή των δεδομένων.....	56
2.1.6. Παρουσίαση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων	57
2.3. Μεγέθη επίδρασης και στατιστικά μοντέλα	58
2.4. Έλεγχος ετερογένειας.....	62
2.5. Διάστημα εμπιστοσύνης	64
2.6. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης.....	65
2.7. Τυποποιημένη διαφορά μέσων (Standardized Mean Difference).....	67

2.8. Διαδικασία καταλογισμού στα ελλείποντα δεδομένα	68
2.9. Στατιστικό πακέτο STATA	69
2.9.1 Εντολές που χρησιμοποιήθηκαν μέσω STATA	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα	77
3.1. Βάση δεδομένων και λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν	77
3.2. Επιλογή μελετών και εξαγωγή δεδομένων	77
3.3. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης σε επίπεδο χημικών ενώσεων.....	107
3.3.1. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για τις μεθόδους χρώσεων Τετραζολίου ...	112
3.3.2. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για την SRB μέθοδο	115
3.3.3. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για την μέθοδο Crystal Violet.....	118
3.4. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση πιθανής ισοδυναμίας μεταξύ των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας.....	120
3.5. Εφαρμογή τυποποιημένης διαφοράς μέσων	123
3.6. Συγκεντρωτική μετα-ανάλυση για τον έλεγχο της δράσης της ξανθοχουμόλης ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων (SRB, Tetrazolium dye, CV)	125
3.7. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση συσχέτισης αντιπολλαπλασιαστικής δράσης με τον χρόνο επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση	129
3.8. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των χημικών ενώσεων ανάμεσα στις καρκινικές και μη κυτταρικές σειρές.....	131
3.9. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης κατηγοριοποιώντας τις χημικές ενώσεις σε φλαβονοειδή και πικρά οξέα	132
3.10. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης κατηγοριοποιώντας τις χημικές ενώσεις σε χαλκόνες- φλαβόνες- α-β- οξέα	138
3.11. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των φλαβονοειδών, πικρών οξέων, χαλκονών, φλαβονών και των α- β- οξέων ανάμεσα στις καρκινικές και τις κανονικές κυτταρικές σειρές.....	144
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συζήτηση	147
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Βιβλιογραφία	150
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Παράρτημα	159
6.1. Πειράματα τα οποία απορρίφθηκαν λόγω μοναδικότητας σε ορισμένα χαρακτηριστικά τους	159

Περίληψη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Ο λυκίσκος είναι ένα πολυετές δίοικο φυτό το οποίο ανήκει στην κατηγορία των κανναβινοειδών και είναι κυρίως γνωστό στην βιομηχανία της ζυθοποιίας. Οι θηλυκοί του κώνοι χρησιμοποιούνται προκειμένου να προσδώσουν την χαρακτηριστική πικρή γεύση και τις αρωματικές ουσίες, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζουν την βακτηριακή ανάπτυξη. Ποικίλες χημικές ενώσεις με καταπραϋντική, οιστρογόνο, αντιοξειδωτική δράση, αντιμικροβιακές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες έχουν βρεθεί στους θηλυκούς κώνους. Στην παρούσα εργασία, αναλύσαμε μέσω της μετα-ανάλυσης τον τρόπο με τον οποίο κάθε χημική ένωση επηρεάζει την βιωσιμότητα των διαφόρων καρκινικών κυττάρων συγκρίνοντας την συγκέντρωση IC50 (μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση) που εκτιμάται από κάθε μέθοδο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Πραγματοποιήθηκε μια διεξοδική βιβλιογραφική αναζήτηση προκειμένου να εξαχθούν όλες οι πιθανές μελέτες που ερευνούν την αντιπολλαπλασιαστική δράση του λυκίσκου σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Για κάθε μελέτη καταγράψαμε πληροφορίες όπως την μέθοδο μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας (SRB, Tetrazolium dye, Crystal Violet), την κυτταρική σειρά (καρκινική ή μη), τον τύπο καρκίνου, τον χρόνο επώασης με την χημική ένωση (24, 48 ή 72 ώρες), των αριθμό των επαναλήψεων ενός πειράματος καθώς και τον δείκτη IC50 μαζί με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Τα δεδομένα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, ανάλογα με την μέθοδο. Τόσο η μετα-ανάλυση όσο και οι περαιτέρω στατιστικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το StataSE13.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από την βιβλιογραφική αναζήτηση που πραγματοποιήθηκε ανασύρθηκαν συνολικά 622 άρθρα, εκ των οποίων τα 61 πληρούσαν όλα τα κριτήρια για την εισαγωγή τους στην διαδικασία της μετα-ανάλυσης. Συμπεριλήφθηκαν δεδομένα από 317 συνολικά πειράματα σε κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων τα 139 αφορούσαν την μέθοδο SRB, 153 τις μεθόδους που χρησιμοποιούν άλατα τετραζολίου και μόλις 25 την μέθοδο CV. Η μετα-ανάλυση των μελετών, έδειξε ότι η χημικές ενώσεις του λυκίσκου κατέχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με την ξανθοχουμόλη να είναι η πιο ισχυρή. Τα αποτελέσματα από τις 3 διαφορετικές μεθόδους μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας (SRB, Tetrazolium dye, CV) μας υποδεικνύουν ότι είναι συγκρίσιμες και μπορούν να

χρησιμοποιηθούν όλες εξίσου. Τέλος, ο χρόνος επώασης των κυττάρων με τις αντίστοιχες χημικές ενώσεις, έδειξε να έχει σημαντική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα, καθώς όσο αυξάνεται ο χρόνος τόσο μειώνεται ο δείκτης IC50.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η ξανθοχουμόλη παρουσιάζει ορισμένα αξιοσημείωτα αποτελέσματα αναφορικά με την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Την ίδια στιγμή φαίνεται να μην επηρεάζει στον ίδιο βαθμό την βιωσιμότητα των υγιών κυττάρων. Θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες για την συστηματική διερεύνηση των υπόλοιπων χημικών ενώσεων του λυκίσκου.

Λέξεις κλειδιά: Λυκίσκος, Χημικές ενώσεις, Καρκίνος, Κυτταρική βιωσιμότητα, Συστηματική ανασκόπηση, Μετα-ανάλυση

Abstract

INTRODUCTION: *Humulus lupulus*, commonly named hops, is a flowering plant in the hemp family *Cannabaceae* mostly known in brewing industry as its female cones are used to impart bitter taste and aromatic flavors inhibiting at the same time bacterial growth. Several compounds with sedative, estrogenic, antioxidant activity, antimicrobial properties and antiproliferative properties are found in the female cones. In the present study, we analyze with meta-analysis the way each compound affects viability of different cancer cell lines in time and compare the concentration IC50 (half maximal inhibitory concentration) estimates from various methods.

MATERIALS AND METHODS: An inclusive literature search was performed to retrieve all possible studies investigating anti-proliferative effect of hops on different cell lines. For each article we recorded information such as assays for the determination of cell viability (SRB, Tetrazolium dye, Crystal Violet), cell lines (cancerous or non), cancer type, time of incubation with compound (24, 48 or 72 hours), number of replicates and IC50 along with its standard deviation. The data were divided into 3 groups, according to the assay. Meta-analysis was performed using StataSE13.

RESULTS: A total of 622 articles were retrieved from the literature search, of which 61 met all the criteria for inclusion in the meta-analysis process. Data from a total of 317 cell line experiments were included, of which 139 involved the SRB assay, 153 the Tetrazolium dye assays, and only 25 the CV assay. The meta-analysis of the studies showed that the chemical compounds of hops exert inhibitory effects on the growth of cancer cells with xanthohumol being the most powerful. The results from the 3 different cell viability measurement methods (SRB, Tetrazolium dye, CV) indicate to us that they are comparable and can all be used interchangeably. Finally, the incubation time of the cells with the corresponding chemical compounds was shown to have a significant effect on the result as the longer the time is, the lowest IC50 is observed.

CONCLUSIONS: Xanthohumol shows some remarkable results in inhibiting the growth of cancer cells. At the same time, it seems not to affect the viability of healthy

cells to the same extent. Further investigations should be performed to systematically investigate the effect of other hop compounds.

Key words: Hops, Chemical compounds, Cancer, Cell viability, Systematic review, Meta-analysis

Απόδοση συντομογραφιών

SRB	Sulforhodamine B
NRU	Neutral Red Uptake
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
IC50	Half maximal inhibitory concentration
CV	Crystal Violet

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1. Λυκίσκος

Η οικογένεια των κανναβοειδών (Hemp) περιλαμβάνει περίπου 170 είδη φυτών τα οποία είναι ομαδοποιημένα σε 11 γένη, εκ των οποίων τα πιο γνωστά είναι η κάνναβης (Cannabis), η κελτίδα (Celtis) και ο λυκίσκος (Humulus) [1]. Ο λυκίσκος, ο οποίος αποτελεί το αντικείμενο της ερευνάς μας, πρόκειται για ένα γνωστό στο ευρύ κοινό φυτό, κυρίως για την χρησιμοποίησή του στην παραγωγή ζύθου. Η πρώτη αναφορά στον λυκίσκο έγινε το 768 μ.Χ. όταν ο βασιλιάς Πιπίνος, πατέρας του Καρλομάγνου, δώρισε το συγκεκριμένο φυτό σε ένα μοναστήρι στο Παρίσι [2]. Τα διασημότερα είδη λυκίσκου είναι ο κοινός λυκίσκος (*Humulus lupulus*) και ο Ιαπωνικός λυκίσκος (*Humulus japonicus*). Ο κοινός λυκίσκος, εικόνα 1, είναι μια πολυετή αναρριχώμενη πόα η οποία μπορεί να φτάσει έως και τα 10 μέτρα, ενώ μπορεί να ζήσει μέχρι 20 χρόνια. Τα φύλλα του έχουν σκούρο-πράσινο χρώμα και το σχήμα τους μοιάζει με αυτό της καρδιάς, έχουν 3-5 λοβούς και είναι οδοντωτά. Τα άνθη του είναι κρεμασμένοι πρασινοκίτρινοι κώνοι (εικόνα 1) και εμφανίζονται τους καλοκαιρινούς μήνες, κυρίως Ιούλιο με Αύγουστο. Ακόμη, τον συναντάμε σε πλούσια, υγρά και ημισκιερά εδάφη, πάνω σε κορμούς δέντρων όπου αναρριχάται πολλά μέτρα [3].

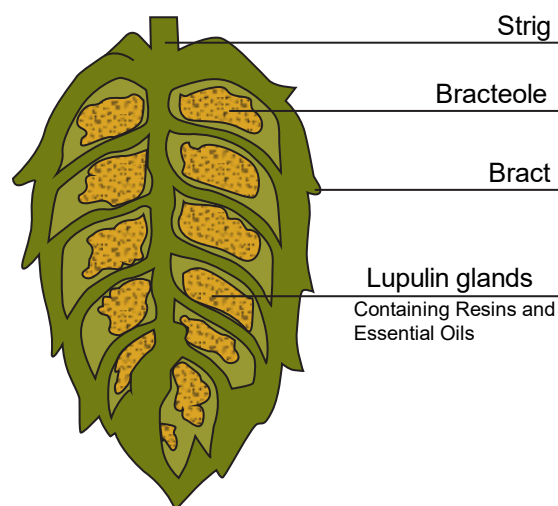


Εικόνα 1- Ο κοινός λυκίσκος, *Humulus lupulus* (αριστερά) [4] και οι θηλυκοί πρασινοκίτρινοι κώνοι του (δεξιά) [5].

Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες λυκίσκου, ανάλογα με την περιοχή στην οποία καλλιεργούνται με τις πέντε πιο κοινές να είναι [6]:

- Ποικιλία *lupulus* – Ευρώπη, Δυτική Ασία
- Ποικιλία *cordifolius* – Ανατολική Ασία
- Ποικιλία *lupuloides* – Ανατολική Βόρεια Αμερική
- Ποικιλία *neomexicanus* – Δυτική Βόρεια Αμερική
- Ποικιλία *pubescens* - Μεσοδυτική και Ανατολική Βόρεια Αμερική

Επιπλέον, πρόκειται για ένα δίοικο φυτό, δηλαδή εντοπίζονται δύο κατηγορίες φυτών ανάλογα με το φύλο τους, τα αρσενικά και τα θηλυκά φυτά. Από την μια, τα στημονοφόρα (αρσενικά) φυτά περιέχουν πολλά κλαδιά στα οποία φέρουν μικροσκοπικά άνθη. Από την άλλη, τα φυτά που έχουν ύπερο (θηλυκά) παρουσιάζουν μεγαλύτερα πέταλα καθώς και τους χαρακτηριστικούς κώνους (οι οποίοι ονομάζονται και στρόβιλοι), που φαίνονται στην εικόνα 1. Ακόμη, στα αρσενικά φυτά υπάρχει γύρη η οποία με την βοήθεια του αέρα μπορεί να επικονιάσει τα θηλυκά φυτά με αποτέλεσμα να εντοπίσουμε στους κώνους τους διάφορους σπόρους, οι οποίοι είναι ανεπιθύμητοι καθώς μπορούν να βλάψουν το τελικό μας προϊόν. Για τον λόγο αυτόν είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν τα αρσενικά φυτά στην περιοχή όπου βρίσκονται τα θηλυκά [7]. Επιπρόσθετα, στην βάση των θηλυκών κώνων υπάρχουν τα αδενικά τριχώματα τα οποία καλύπτουν τους αδένες λουπουλόνης, εικόνα 2. Σε αυτούς τους αδένες γίνεται η βιοσύνθεση ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τα τερπενοειδή και οι φαινολικές ενώσεις [8]. Ο λυκίσκος και κυρίως οι θηλυκοί κώνοι, εξαιτίας της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε μεγαλύτερες ποσότητες, έχουν μετατραπεί εδώ και πολλές δεκαετίες σε έναν πόλο οικονομικού και κοινωνικού ενδιαφέροντος. Η χρησιμοποίηση του στην παραγωγή ζύθου, αλλά και στην προσπάθεια διερεύνησης των βιολογικών του δραστηριοτήτων, αποτελούν τα κύρια πεδία που θα αναλύσουμε περαιτέρω στις επόμενες υποενότητες.



Εικόνα 2- Η ανατομία ενός θηλυκού κώνου [9].

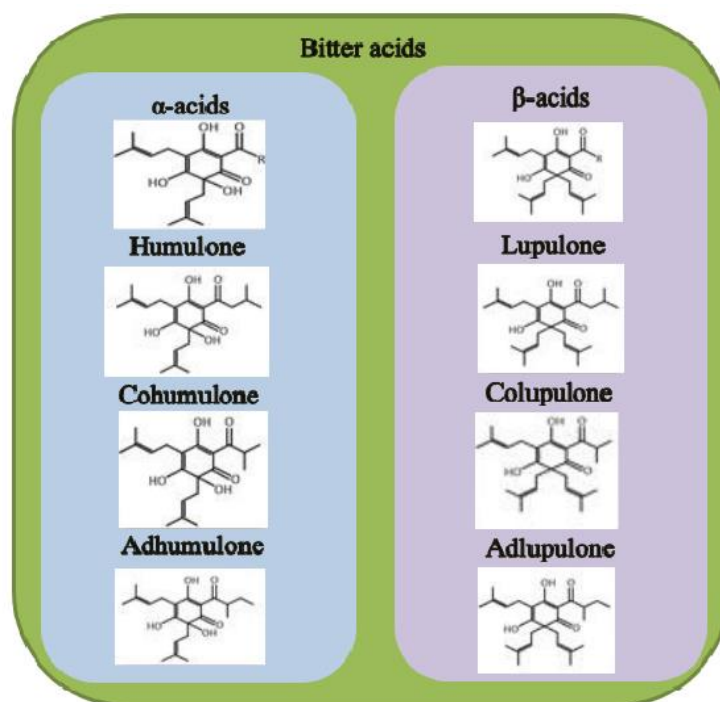
1.1.1 Χημική σύσταση λυκίσκου

Όπως και σε όλα τα φυτά, έτσι και στον λυκίσκο, έχουμε την δυνατότητα να ξεχωρίσουμε τις χημικές ενώσεις σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες αφορούν σύμπλοκα που σχετίζονται με την θρέψη, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του φυτού. Τέτοιοι μεταβολίτες είναι τα σάκχαρα, τα λιπίδια, τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και όλα τα παράγωγα τους. Από την άλλη, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν απαραίτητα άμεση συσχέτιση με τις παραπάνω λειτουργίες. Εμπλέκονται συνήθως στην αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον, στην προστασία του από τους θηρευτές, τα παράσιτα, τις ακραίες καιρικές συνθήκες και άλλες απειλές. Επιπλέον, προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς φαίνεται να έχουν ύψιστης σημασίας βιολογικές ιδιότητες. Κυρίως οι θηλυκοί κώνοι είναι αυτοί που χρησιμοποιούνται στην έρευνα καθώς παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες των συγκεκριμένων μεταβολιτών. Επομένως, οι τρεις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στους θηλυκούς κώνους είναι οι εξής :

- ο Πικρά οξέα (Bitter acids)
- ο Πολυφαινόλες (Polyphenols)
- ο Συστατικά των αιθέριων ελαίων

1.1.1.1 Πικρά οξέα

Εξαιτίας της πικρής τους γεύσης η ονομασία πικρά οξέα έχει υιοθετηθεί από την βιβλιογραφία. Όσον αφορά την χημική τους δομή, έχουν τουλάχιστον μια καρβοξυλιωμένη και δύο πρενυλιωμένες αλυσίδες. Αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του μεταβολισμού των κώνων, καθώς αντιπροσωπεύουν περίπου το 10 έως 20% του ξηρού τους βάρους. Έχουμε την δυνατότητα να κατηγοριοποιήσουμε τα πικρά οξέα σε δύο μεγάλες κατηγορίες, εικόνα 3: τα άλφα οξέα (α -acids), τα οποία αφορούν τα παράγωγα της χουμουλόνης (Humulone), και τα βήτα οξέα (β -acids), δηλαδή τα παράγωγα της λουπουλόνης (Lupulone). Οι πιο γνωστές χημικές ενώσεις των άλφα οξέων είναι οι: humulone (35 - 70% των συνολικών άλφα οξέων), cohumulone (20 - 65% των συνολικών άλφα οξέων) και adhumulone (10 - 15% των συνολικών άλφα οξέων). Από την άλλη, τα βήτα οξέα έχουν παρόμοια χημική δομή με τα άλφα οξέα με την μόνη διαφορά ότι έχουν μια παραπάνω πρενυλιωμένη αλυσίδα. Τις χημικές ενώσεις των βήτα οξέων τις εντοπίζουμε σε ανάλογες ποσότητες με αυτές των άλφα οξέων και οι πιο άφθονες είναι αντίστοιχα οι : lupulone, colupulone και adlupulone. Άλλες χημικές ενώσεις, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, είναι αντίστοιχα και για τις δύο κατηγορίες οι prehumulone - prelupulone, posthumulone - postlupulone. Τέλος, οι ποσότητες και των δύο αυτών οξέων καθώς και των ομόλογών τους ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με την ποικιλία του λυκίσκου, το κλίμα και τις συνθήκες καλλιέργειας [10,11].



Εικόνα 3- Κατηγοριοποίηση των πικρών οξέων στις δύο κατηγορίες: α -οξέα (αριστερά) β -οξέα (δεξιά). Επιπλέον, φαίνονται και οι πιο άφθονες χημικές ενώσεις τις κάθε κατηγορίας μαζί με τις χημικές τους δομές.

1.1.1.2 Πολυφαινόλες

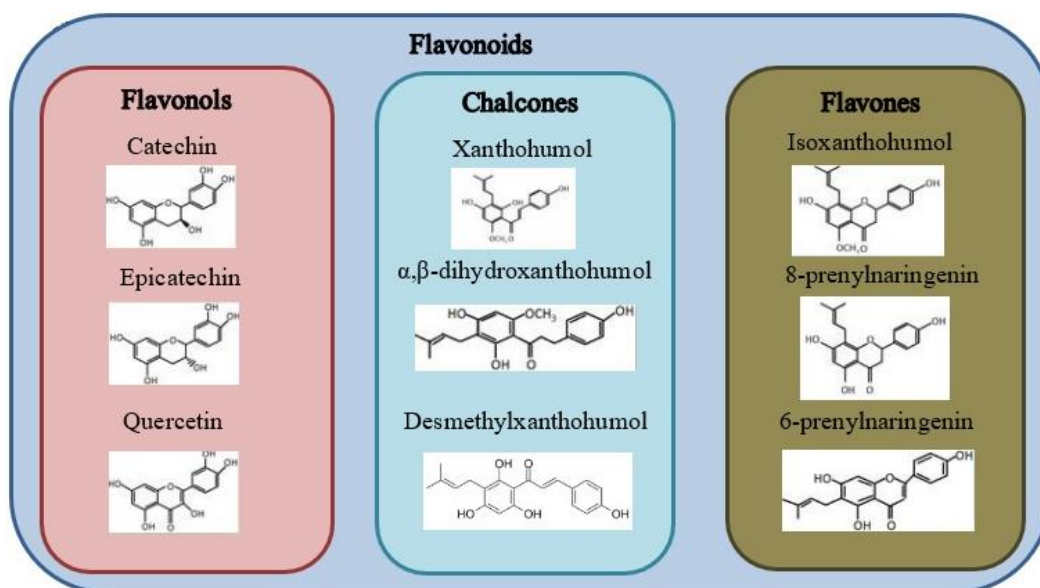
Οι Πολυφαινόλες έχουν ως κύριο ρόλο την προστασία του φυτού από κάθε είδους εξωτερική απειλή. Οι κώνοι του λυκίσκου έχουν 10 φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες σε σύγκριση με τα φύλλα του λυκίσκου. Ακόμη, τα φλαβονοειδή (Flavonoids) είναι η πιο ποικιλόμορφη και διαδεδομένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων με διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες μέσα στο φυτό. Στον λυκίσκο έχουμε την δυνατότητα να διαχωρίσουμε 3 μεγάλες κατηγορίες φλαβονοειδών, εικόνα 4, οι οποίες είναι οι εξής : χαλκόνες (chalcones), φλαβόνες (flavones) και φλαβονόλες (flavonols).

Οι χημικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των χαλκονών είναι οι πρώτες βιογενετικά παραγόμενες στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Δομικά αποτελούνται από δύο δακτυλίους C6 οι οποίοι συνδέονται με μια κορεσμένη τρι-ανθρακική

αλυσίδα. Η κυριότερη χημική ένωση αυτής της κατηγορίας είναι η ξανθοχουμόλη (Xanthohumol), η οποία αντιπροσωπεύει περισσότερο από 1% του ξηρού βάρους των κώνων και βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών για μια πληθώρα εφαρμογών. Η ξανθοχουμόλη προέρχεται από την χημική ένωση δεσμέθυλοξανθοχουμόλη (Desmethylxanthohumol), η οποία είναι η δεύτερη κυριότερη χημική ένωση στην κατηγορία των χαλκονών και αντιπροσωπεύει το 0.1 με 0.5% του ξηρού βάρους των κώνων. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές ακόμη χημικές ενώσεις, ελάσσονος σημασίας, με την μοναδική που αξίζει να αναφέρουμε να είναι η α,β-διϋδροξανθοχουμόλη (α,β-dihydroxanthohumol).

Σε πολλά φυτά, έτσι και στον λυκίσκο, οι χαλκόνες μέσω του ισομερισμού τους μπορούν να μετατραπούν σε φλαβόνες. Πλέον η τρι-ανθρακική αλυσίδα μετατρέπεται σε έναν αρωματικό δακτύλιο όπου υπάρχει μια κετονομάδα στην θέση C4. Η κύρια χημική ένωση των φλαβονών είναι η ίσο-ξανθοχουμόλη (isoxanthohumol) η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 0.008% του ξηρού βάρους των κώνων. Άλλες εξίσου σημαντικές φλαβόνες που έχουν ταυτοποιηθεί είναι η 8-πρενυλναρινγενίνη (8-prenylnaringenin) και η 6-πρενυλναρινγενίνη (6-prenylnaringenin), όμως εντοπίζονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με την ίσο-ξανθοχουμόλη. Η 8-πρενυλναρινγενίνη, το πιο ισχυρό φυτοοιστρογόνο που έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα, καταλαμβάνει περίπου το 0.002% του ξηρού βάρους. Από την άλλη, η 6-πρενυλναρινγενίνη, με μια εξίσου σημαντική φυτοοιστρογόνο δράση, εντοπίζεται σε λίγο μεγαλύτερες ποσότητες.

Η τελευταία κατηγορία φλαβονοειδών αφορά τις φλαβονόλες. Οι φλαβονόλες προέρχονται από τις φλαβόνες ύστερα από την εισαγωγή ενός διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων C2 και C3, εφόσον προηγηθεί μια υδροξυλίωση της θέσης C3 του κεντρικού δακτυλίου. Η πιο κοινές χημικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η κατεχίνη (catechin), η κερσετίνη (quercetin), η καμπφερόλη (kaempferol) και η επικατεχίνη (epicatechin) [10].



Εικόνα 4- Κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών στις 3 μεγάλες υποκατηγορίες. Από αριστερά προς τα δεξιά έχουμε τις φλαβονόλες, τις χαλκόνες και τις φλαβόνες. Σε κάθε κατηγορία παρατηρούμε και τις πιο άφθονες χημικές ενώσεις μαζί με τον χημικό τους τύπο

1.1.1.3 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια σχηματίζονται, όπως και οι περισσότεροι δευτερογενής μεταβολίτες, στα αδενικά τριχώματα των αδένων λουπουλίνης, ακριβώς μετά την βιοσύνθεση των πικρών οξέων, και προσδίδουν στον λυκίσκο την χαρακτηριστική του μυρωδιά καθώς επίσης προσδίδουν στην μύρα άρωμα και γεύση. Πρόκειται για μια ποικιλόμορφη ομάδα πολλών εκατοντάδων χημικών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές, βιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες [12]. Η περιεκτικότητα του λυκίσκου σε αιθέρια έλαια κυμαίνεται από 0,5 έως 3%. Επιπλέον, απαρτίζονται κυρίως από μονοτερπένια (monoterpenes) και σεσκιτερπένια (sesquiterpenes). Κάθε ομάδα μπορεί να υποδιαιρεθεί επίσης σε οξυγονωμένα και μη-οξυγονωμένα τερπένια. Τα μη-οξυγονωμένα τερπένια εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (περίπου 70%) σε σύγκριση με τα οξυγονωμένα τερπένια. Τα μονοτερπένια κατά κύριο λόγο αντιπροσωπεύονται την χημική ένωση β -myrcene σε ποσοστό που φτάνει το 58%. Οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις βρίσκονται σε ασήμαντες συγκεντρώσεις και αφορούν αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες ή εστέρες. Από την άλλη, οι χημικές ενώσεις των

σεσκιτερπενίων περιλαμβάνουν τις : α -humulene (σχεδόν 52%), β -caryophyllene (15%), γ -elemene (14%), β -selinene (11%), β -farnesene (10%). Τα αιθέρια έλαια κάθε ποικιλίας λυκίσκου βρίσκονται σε διαφορετική χημική σύσταση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειώσουμε ότι διαφορετικές ποικιλίας λυκίσκου που καλλιεργούνται στην ίδια γεωγραφική περιοχή, με ίδιες εδαφικές και κλιματικές αλλαγές, πρόκειται να παράγουν διαφορετικά αιθέρια έλαια. Πρόκειται δηλαδή για έναν γενετικό χημειότυπο. Επιπλέον, μερικά τερπενοειδή όπως τα : β -farnesene, α -humulene, α - β - και δ -selinene, α -humulene, α - β - και γ -eudesmol, αποτελούν ορισμένους από τους χημικούς δείκτες για την ταυτοποίηση διαφόρων ποικιλιών του λυκίσκου [10,13].

Η συγκέντρωση μια συγκεκριμένης χημικής ένωσης στα αιθέρια έλαια δεν εξαρτάται μόνο από την ποικιλία του λυκίσκου, τις συνθήκες καλλιέργειας, αποθήκευσης και επεξεργασίας, αλλά και ο τρόπος εξαγωγής με την αναλυτική επεξεργασία τους είναι επίσης ένας πολύ σημαντικός παράγοντας [11]. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι, οι απώλειες αιθέριου ελαίου λόγω οξείδωσης κατά την αποθήκευση (ακόμη και στους 0°C) μπορεί να φτάσουν έως και 30% ή περισσότερο ανάλογα με τη διάρκεια αποθήκευσης. Η συνήθης μέθοδος εξαγωγής των αιθέριων ελαίων από λυκίσκο είναι η μέθοδος απόσταξης με ατμό και η διαδικασία διαρκεί συνήθως 4 ώρες. Ακόμη, η αέρια ανάλυση χρωματογραφίας (gas chromatography) σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) των αιθέριων ελαίων λυκίσκου χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για την ταυτοποίηση των διαφόρων χημικών ενώσεων [13].

1.1.2 Χρήση του λυκίσκου στην παραγωγή ζύθου

Μια από τις πιο ευρέως γνωστές χρήσεις του λυκίσκου είναι αυτή στην βιομηχανία της ζυθοποιίας. Το γεγονός ότι ο λυκίσκος χρησιμοποιείται στην ζυθοποιία παρουσιάζεται για πρώτη φορά τον 9^ο αιώνα στο καταστατικό του ηγούμενου Addot Adalhardus στο μοναστήρι του Corvey, στον ποταμό Weser, στην

Γερμανία, ο οποίος καθόριζε τα καθήκοντα των μυλωνάδων στα κτήματα του μοναστηριού. Τα καθήκοντα αυτά αφορούσαν την σπορά σπόρων, την παρασκευή βύνης και την συγκέντρωση καυσόξυλων και λυκίσκου [14].

Κατά την διάρκεια του Μεσαίωνα και ύστερα, το φυτό Ψευδομυρίκη η γαλή (*Myrica gale* L.) χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον λυκίσκο για την παραγωγή μύρας. Όμως, στις μέρες μας ο λυκίσκος είναι αυτός που κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην ζυθοποιία καθώς έχει αποδειχθεί ότι περιέχει πιο ποιοτικούς συντηρητικούς παράγοντες οι οποίοι παρατείνουν την βιωσιμότητα της μύρας. Επιπλέον, τα τελευταία εκατό περίπου χρόνια οι θηλυκοί κώνοι είναι αυτοί που μονοπωλούν το ενδιαφέρον των παραγωγών, καθώς δεν παράγουν ούτε καρπούς ούτε γύρη. Ο λυκίσκος περιέχει οξέα και έλαια, τα οποία προέρχονται από τους αδένες λουπουλόνης των θηλυκών κώνων και προσδίδουν πικράδα, άρωμα και γεύση στην τελική μύρα [2].

Για την παρασκευή μύρας χρειάζονται μόνο λίγα υλικά. Στην πραγματικότητα, ο γερμανικός νόμος για την καθαρότητα της μύρας απαιτεί η μύρα να παρασκευάζεται μόνο από νερό, λυκίσκο, κριθάρι (βύνη) και μαγιά. Παρόλο που ο λυκίσκος βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά της μύρας, είναι αυτός με την μεγαλύτερη επίδραση στο τελικό προϊόν. Επίσης, ο λυκίσκος προστίθεται στο στάδιο του βρασμού κατά την διάρκεια της παρασκευής, καθώς χρειάζεται αρκετός χρόνος (περίπου μία ώρα) για να απελευθερωθούν τα άλφα οξέα που πικραίνουν και εξισορροπούν τη γλύκα της βύνης. Όπως είναι κατανοητό μια διαφορετική ποικιλία λυκίσκου θα έχει ως αποτέλεσμα να μας δώσει και ένα διαφορετικό τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, υπάρχουν ποικιλίες λυκίσκου οι οποίες χρησιμοποιούνται για να προσδώσουν στην μύρα μόνο άρωμα και γεύση ενώ άλλες πικράδα και σταθερότητα. Βέβαια, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τύποι λυκίσκου είναι αυτοί που θα συνεισφέρουν συγχρόνως σε όλους τους παραπάνω τομείς. Οι ποικιλίες λυκίσκου διαχωρίζονται ανάλογα με την περιεκτικότητα τους σε άλφα οξέα. Πιο συγκεκριμένα, οι αρωματικές ποικιλίες λυκίσκου περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση άλφα οξέων (χαμηλότερα από 10%) και θα πρέπει να προστίθενται σε μεταγενέστερο στάδιο κατά τον βρασμό (τα τελευταία 10 με 15 λεπτά). Οι πιο κοινές χημικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα και την γεύση της μύρας είναι οι :

- **β-myrcene** : Φρουτώδεις γεύσεις. Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις (περίπου 50%)
- **α-caryophyllene** : Ξυλώδης και πικάντικη γεύση
- **β-caryophyllene** : Μαύρο πιπέρι και πικάντικη γεύση
- **β-farnesene** : Φρεσκάδα και ξυλώδη αρώματα. Η συγκέντρωση του στον λυκίσκο είναι χαμηλότερη από 1%

Δεδομένη είναι η παρουσία επιπλέον χημικών ενώσεων στις αρωματικές ποικιλίες λυκίσκου, όμως πιθανότατα να βρίσκονται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα και η συνεισφορά τους να μην είναι τόσο σημαντική στο τελικό προϊόν. Εν αντιθέσει των αρωματικών ποικιλιών λυκίσκου, οι πικρές ποικιλίες συνθέτουν ορισμένες φορές περισσότερο από 15% άλφα οξέα. Ανάλογα με την πικράδα που επιθυμούμε να προσδώσουμε στην μύρα τότε τόσο πιο νωρίς θα πρέπει να εισάγουμε τον λυκίσκο στην διαδικασία του βρασμού [15]. Κατά την έκθεση του λυκίσκου σε υψηλές θερμοκρασίες (100 - 130 °C) και pH (8-10), όπως ακριβώς γίνεται στον βρασμό κατά την διάρκεια παραγωγής της μύρας, πραγματοποιείται ο ισομερισμός των άλφα οξέων σε ίσο-άλφα οξέα (iso-alpha acids) τα οποία πικρίζουν την μύρα [10]. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η παρουσία των ίσο-άλφα οξέων τόσο πιο πικρή θα είναι η τελική μύρα. Σε αυτή την θεωρία βασίστηκε και η εύρεση της Διεθνούς Μονάδας Πικράδας [International Bitterness Units (IBU)], η οποία μετράει τα iso-alpha-acids για την βαθμολόγηση της πικράδας στις μύρες [16].

Ακόμη, τα αιθέρια έλαια όπως αναφέραμε προσδίδουν άρωμα στην μύρα. Όμως, οι περισσότερες χημικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων χάνονται κατά την διάρκεια του βρασμού, εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας τους στο νερό και της γρήγορης εξάτμισής τους. Η παρουσία τους στην μύρα εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε ένωσης. Τα σεσκιτερπένια έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού από τα μονοτερπένια. Μετά τον βρασμό το 85-95% των ελαίων έχει εξατμιστεί. Για τον λόγο αυτόν, γίνεται χρήση της διαδικασίας dry hopping κατά την οποία ο λυκίσκος προστίθεται μετά την πρώτη ζύμωση και πριν την εμφιάλωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα αιθέρια έλαια να μην εξατμίζονται και να ενισχύεται το άρωμα της μύρας [10].

Επιπλέον, εκτός από τα πλεονεκτήματα όσφρησης και γεύσης που προσφέρει στην μύρα, ο λυκίσκος συμβάλλει επίσης στην εμφάνιση της καθώς ενισχύει και

σταθεροποιεί τον αφρό της. Στην ουσία ο αφρός είναι ένα σύστημα δύο φάσεων, στο οποίο μια αέρια φάση διασπείρεται σε μικρή ποσότητα υγρού σε μεταγενέστερη φάση. Ορισμένες πρωτεΐνες της μύρας έχουν ένα υδρόφοβο άκρο που έλκεται από το αέριο και ένα υδρόφιλο άκρο που έλκεται από το υγρό που περιβάλλει το αέριο. Αυτές οι πρωτεΐνες στοιχίζονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τις φυσαλίδες. Τα iso-alpha acids του λυκίσκου βοηθούν στην γεφύρωση αυτών των πρωτεϊνών και λόγω του ότι είναι υδρόφοβα μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση της μύρας [17].

Τέλος, οι αντιβακτηριδιακές ιδιότητες του λυκίσκου βοηθούν σημαντικά στην επέκταση της βιωσιμότητας της μύρας. Αυτή η δυναμική του λυκίσκου προέρχεται κυρίως από τα πικρά οξέα και ενισχύεται από τον βαθμό υδροφοβικότητας αυτών των ενώσεων, κάτι το οποίο συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με την βακτηριακή μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα προκύπτει να μπορούν να καταπολεμήσουν αποτελεσματικά τα θετικά κατά Gram βακτήρια, μερικά από τα οποία είναι τα βακτήρια *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* και *Streptomyces* [10].

1.1.3. Η δράση του λυκίσκου στην παθοφυσιολογία του ανθρώπου

Όπως είναι ευκόλως αντιληπτό, η φήμη που έχει αποκτήσει ο λυκίσκος οφείλεται κατά κύριο λόγο για τα οφέλη που φαίνεται να προσφέρει στον ζύθο. Όμως, τα τελευταία χρόνια δημιουργείται εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον γύρω από τις πολλά υποσχόμενες βιολογικές δράσεις του. Οι πρώτες αναφορές για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του λυκίσκου μας ταξιδεύουν αρκετά πίσω στον χρόνο, περίπου δύο χιλιάδες χρόνια πριν, εκεί όπου οι αρχαίοι θεραπευτές έκαναν χρήση του λυκίσκου κατά της λέπρας, της δυσκοιλιότητας και της δυσοσμίας των ποδιών. Η χημική ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι χημικές ενώσεις του λυκίσκου

προσδίδουν αντιστοίχως στο φυτό ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικά σημαντικών ιδιοτήτων, μερικές εκ των οποίων αναφέρονται παρακάτω:

1.1.3.1. Ηρεμιστική δράση

Η ηρεμιστική δράση του λυκίσκου προέκυψε για πρώτη φορά χωρίς να έχει γίνει κάποιο ερευνητικό πείραμα, αλλά μέσω των εργατών οι οποίοι εργάζονταν στην συγκομιδή και την επεξεργασία των κώνων του λυκίσκου. Εκείνοι δήλωναν αισθήματα κόπωσης, χαλάρωσης και υπνηλίας και για τον λόγο αυτόν, μετέπειτα χρησιμοποιήθηκε για την βελτίωση της ποιότητας του ύπνου των ανθρώπων [12]. Ύστερα από τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί βρέθηκε ότι, τα πικρά οξέα, η ξανθοχουμόλη, η ένωση myrcenol (παράγωγο της β-myrcene) και ορισμένα τερπένια, εμπλέκονται στις καταπραϋντικές ιδιότητες του λυκίσκου. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι αλληλοεπιδρούν με συγκεκριμένους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών, κυρίως με τον υποδοχέα GABA_A, αλλά και τους υποδοχείς μελατονίνης και σεροτονίνης (οι οποίοι έχουν άμεση συσχέτιση με τον ύπνο και την διάθεση του ανθρώπου) [10].

1.1.3.2. Οιστρογονική δράση

Η οιστρογόνο δράση του λυκίσκου οφείλεται κυρίως στην παρουσία της χημικής ένωσης 8-πρενυλναρινγενίνη, η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι το πιο ισχυρό φυτοοιστρογόνο έως σήμερα. Αυτό οφείλετε στο γεγονός ότι, έχει μια ισχυρή δεσμευτική ικανότητα με τους υποδοχείς οιστρογόνων, ERα και ERβ (με μια μεγαλύτερη προτίμηση στον υποδοχέα ERα). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η

εμμηνόπαυση είναι μια διαδικασία σταδιακής μείωσης των οιστρογόνων και σχετίζεται με δυσάρεστα συμπτώματα, όπως οι εναλλαγές στην διάθεση, η έλλειψη ενέργειας αλλά και ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης οστεοπόρωσης. Η θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθείτε είναι η ορμονοθεραπεία (Hormone replacement therapy), όμως υπάρχει υψηλός κίνδυνος δημιουργίας ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως η θρόμβωση και η εμφάνιση καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Επομένως, η 8-πρενυλναρινγενίνη, ως ένα δυνατό φυτοοιστρογόνο για την εναλλακτική χρήση του έναντι της ορμονοθεραπείας, έχει αποδειχθεί, στα έως τώρα πειράματα ότι έχει την δυνατότητα να παρεμποδίζει σε ικανοποιητικό βαθμό την εμφάνιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης. Ακόμη, έχει αξιολογηθεί ότι η 8-πρενυλναρινγενίνη έχει την δυνατότητα να αποτρέπει την απώλεια της οστικής μάζας σε οργανισμούς-μοντέλα (όχι σε ανθρώπους), στους οποίους έχει παρατηρηθεί οστεοπόρωση, ως σύμπτωμα της εμμηνόπαυσης. Εν αντιθέσει της 8-πρενυλναρινγενίνης, η 6-πρενυλναρινγενίνη και άλλα παράγωγα, έχουν αρκετά πιο αδύναμες οιστρογονικές ιδιότητες. Τέλος, ένα σημαντικό θέμα που προκύπτει είναι το γεγονός ότι η 8-πρενυλναρινγενίνη βρίσκεται σε αρκετά μικρές ποσότητες μέσα στον λυκίσκο, με αποτέλεσμα να τίθεται θέμα όσον αφορά την διαθεσιμότητα της συγκεκριμένης χημικής ένωσης. Για τον λόγο αυτόν, εξίσου σημαντικό ρόλο έχει η χημική ένωση ίσο-ξανθοχουμόλη, η επικρατέστερη φλαβόνη, η οποία θεωρείται ως ένα προ-οιστρογόνο, καθώς έχει την δυνατότητα να απομεθυλιωθεί σε 8-πρενυλναρινγενίνη μέσω του ανθρώπινου μικροβιώματος του εντέρου [10,18].

1.1.3.3. Αντιμικροβιακή δράση

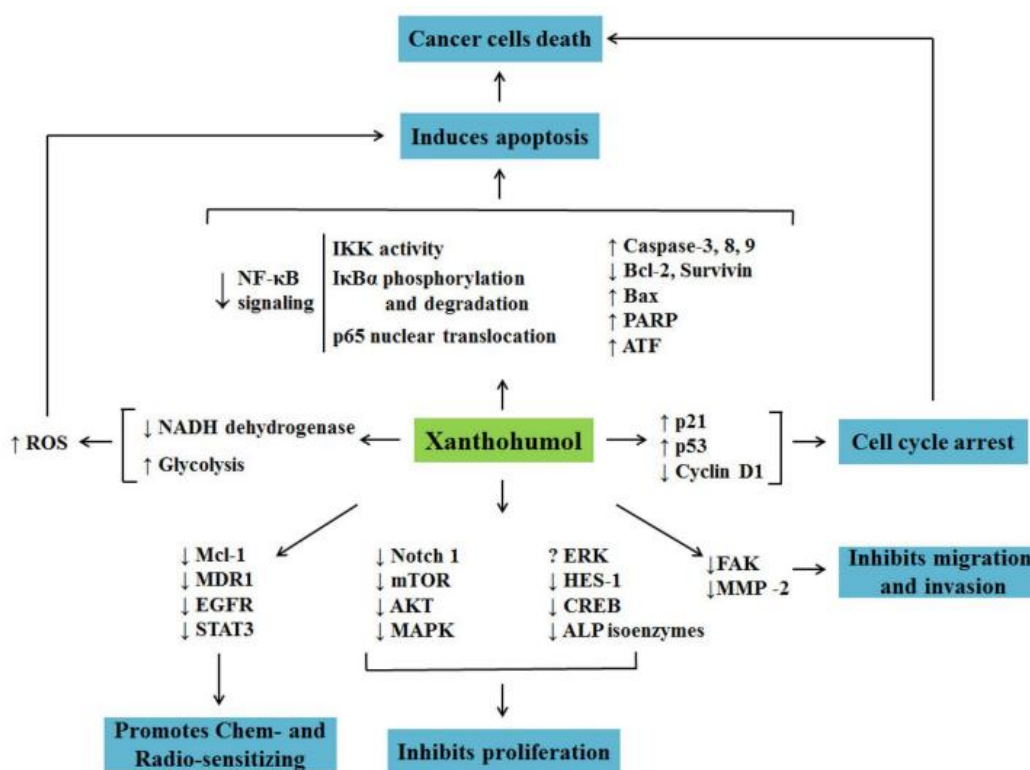
Η αντιμικροβιακή δράση οφείλεται σε ορισμένες χημικές ενώσεις του λυκίσκου οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την αναπαραγωγή διαφόρων οργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι ιοί, οι μύκητες και τα πρωτοζωικά παράσιτα. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως αυτές οι ιδιότητες του λυκίσκου οφείλονται κυρίως στα πικρά οξέα, όπου χάρης σε αυτήν την αντιμικροβιακή του δράση χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία της ζυθοποιίας. Πέρα από τα θετικά κατά

Gram βακτήρια που αναφέραμε, έχει διερευνηθεί και η δράση του λυκίσκου στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Μερικά από τα βακτήρια στα οποία παρατηρήσαμε θετικά αποτελέσματα είναι τα: *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Escherichia coli* και *Chlamydia pneumoniae*. Επιπλέον, μερικοί από τους μύκητες και τα παράσιτα, των οποίων παρεμποδίζεται η αναπαραγωγή είναι τα: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* και *Plasmodium falciparum*. Τέλος, οι αντιικές δραστηριότητες του λυκίσκου οφείλονται κυρίως στην ξανθοχουμόλη, αφού έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη ορισμένων ιών όπως τον ιό της ηπατίτιδας γ (Hepatitis C Virus), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) και διάφορων ιών του έρπητα [10,12].

1.1.3.4. Αντικαρκινική δράση

Ορισμένες χημικές ενώσεις του λυκίσκου και ιδιαίτερα η ξανθοχουμόλη έχουν παρουσιάσει μερικά αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά, τα οποία αφορούν την παρεμπόδιση της έναρξης ή της εξέλιξης διαφόρων σταδίων της καρκινογένεσης. Η πληθώρα μελετών που υπάρχει, επικεντρώνεται κυρίως σε *in vitro* πειράματα και σε μικρότερο βαθμό σε *in vivo* πειράματα, τα οποία εξετάζουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες των χημικών ενώσεων του λυκίσκου. Η κυτταροτοξικότητα που παρουσιάζουν οι χημικές ενώσεις του ποικίλλουν σημαντικά και εξαρτάται από το είδος της χημικής ένωσης αλλά και το είδος της καρκινικής κυτταρικής σειράς που δοκιμάζεται κάθε φορά. Όσον αφορά την ξανθοχουμόλη έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό ο μηχανισμός με τον οποίο αλληλοεπιδρά προκειμένου να μπορεί να θεωρηθεί ως ένας υποψήφιος αντικαρκινικός παράγοντας. Πρώτον, η ξανθοχουμόλη αναστέλλει τα μονοπάτια-μόρια σηματοδότησης Akt και NF-κΒ, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάσταση του καρκίνου. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως είναι οι Bax, PARP, AIF, caspase -3, -8, -9, και η παράλληλη μείωση της συγκέντρωσης των αντί-

αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, εμπλέκονται στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων που προκαλείται από την ξανθοχουμόλη. Ακόμη, η μείωση των Notch1, mTOR, STAT3 μεσολαβούν στην ανασταλτική δράση της ξανθοχουμόλης στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, η ξανθοχουμόλη προκαλεί την διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p21 και cyclin D1, ενώ η μείωση των FAK και MMP-2 εμπλέκεται στην παρεμπόδιση των διαδικασιών της μετανάστευσης (migration) και της εισβολής (invasion) των καρκινικών κυττάρων. Συγκεντρωτικά, όπως φαίνεται η ξανθοχουμόλη έχει την δυνατότητα να επηρεάσει μια σειρά βασικών πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (εικόνα 5) [19].



Εικόνα 5- Τα μόρια και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις αντικαρκινικές ιδιότητες της ξανθοχουμόλης [19].

1.1.3.5. Επιπλέον φαρμακευτικές δράσεις

Τέλος θα αναφέρουμε ορισμένες φαρμακευτικές ιδιότητες που έχουν παρατηρηθεί στις χημικές ενώσεις του λυκίσκου, οι οποίες όμως είναι ακόμα υπό συνεχή διερεύνηση. Η ξανθοχουμόλη και η 8-πρενυλναρινγενίνη έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς σε οργανισμούς μοντέλα, όπως τα ποντίκια, για την θεραπευτική τους παρέμβαση στον διαβήτη τύπου 2, στις καρδιαγγειακές παθήσεις και στην παχυσαρκία [20]. Ακόμη, κάποια φλαβονοειδή, όπως η κερσετίνη, η ξανθοχουμόλη, η ίσο-ξανθοχουμόλη και η 8-πρενυλναρινγενίνη, έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην δερματολογία για την θεραπεία δερματικών νόσων, συμπεριλαμβανομένου του ατοπικού εκζέματος, της δερματίτιδας και των διαταραχών της μελάγχρωσης [21].

1.2. Καρκίνος

1.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που μπορεί να ξεκινήσει σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό στο σώμα μας όταν μη φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα, υπερβαίνουν τα συνηθισμένα όρια τους και εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος. Η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται μετάσταση και είναι μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο. Επίσης, τον καρκίνο μπορούμε να τον συναντήσουμε με την ονομασία νεόπλασμα και κακοήθης όγκος [22].

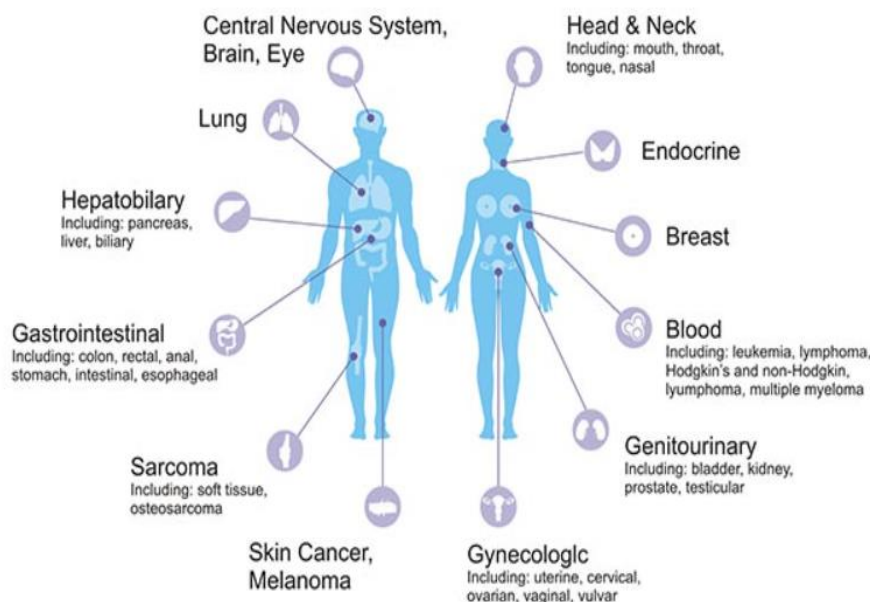
Σύμφωνα με το Κέντρο Διαχείρισης Ασθενειών και Πρόληψης στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ο καρκίνος για τις χρονολογίες 2019 και 2020 ήταν η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στους ανθρώπους μετά τις καρδιοπάθειες, μετρώντας 602.350 θανάτους [23]. Ακόμη, το 2020 ήταν αιτία θανάτου για 10 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, δηλαδή ήταν αιτία για 1 στους 6 θανάτους, οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου από τους οποίους προέρχονται αυτοί οι θάνατοι είναι ο καρκίνος των πνευμόνων, του εντέρου, του ήπατος, του στομάχου και του μαστού [24].

Παρόλο που εντοπίζουμε περισσότερους από 100 τύπους καρκίνων, έχουμε την δυνατότητα να τους κατατάξουμε σε 4 μεγάλες κατηγορίες [25]:

- Καρκίνωμα : Ο καρκίνος που ξεκινάει από το δέρμα ή στους ιστούς που καλύπτουν άλλα όργανα
- Σάρκωμα : Ο καρκίνος των συνδετικών ιστών, όπως των οστών, των μυών, του χόνδρου και των αιμοφόρων αγγείων
- Λευχαιμία : Ο καρκίνος του μυελού των οστών, που παράγει τα αιμοσφαίρια
- Λέμφωμα και μυέλωμα : Καρκίνοι του ανοσοποιητικού συστήματος

Στην εικόνα 6 φαίνονται οι πιο συχνά παρατηρούμενοι τύποι καρκίνων τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες. Πιο, συγκεκριμένα ο καρκίνος στους άντρες προσβάλλει συνηθέστερα όργανα όπως τα πνευμόνια, το παχύ έντερο, ο προστάτης, το στομάχι και το συκώτι ενώ από την άλλη οι γυναίκες καλούνται να

αντιμετωπίσουν τύπους καρκίνου που αφορούν τον μαστό, τον τράχηλο και τον θυροειδή αδένα [26].



Εικόνα 6- Οι πιο συχνά παρατηρούμενοι τύποι καρκίνων στους άντρες (αριστερά) και στις γυναίκες (δεξιά) [26]

1.2.2. Αίτιες που μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο

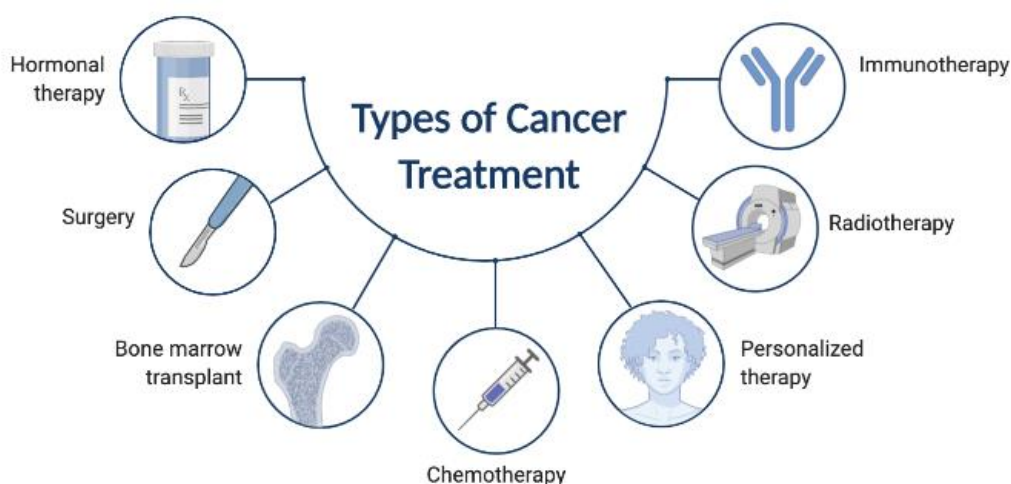
Ο καρκίνος προκαλείται από μεταλλάξεις του DNA μέσα στα κύτταρα. Όπως γνωρίζουμε τα γονίδια μέσα στον γενετικό κώδικα παρέχουν την πληροφορία προκειμένου να εκτελεστούν διάφορες λειτουργίες του κυττάρου όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη και η διαίρεση του. Επομένως, σε περίπτωση που υπάρξει μια μετάλλαξη στην πληροφορία αυτή τότε θα δημιουργηθούν διάφορες δυσλειτουργίες στο κύτταρο οι οποίες μπορούν να το οδηγήσουν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του. Αρχικά, μια μετάλλαξη μπορεί να προκληθεί στον οργανισμό μας εκ γενετής, δηλαδή να κληρονομήσουμε από τους γονείς μας μια τέτοια μετάλλαξη. Όμως, το ποσοστό των καρκίνων που οφείλονται σε τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι ιδιαίτερα μικρό. Από την άλλη, οι περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια της ζωής μας καθώς υπάρχουν

αρκετοί παράγοντες που μπορούν να τις προκαλέσουν. Τέτοιοι είναι : το κάπνισμα, η ακτινοβολία, οι ιοί, διάφορα καρκινογόνα, καθώς και η έλλειψη ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειώσουμε ότι οι γενετικές μεταλλάξεις είναι ένα συχνό φαινόμενο κατά την ανάπτυξη ενός φυσιολογικού κυττάρου. Για τον λόγο αυτό το κύτταρο έχει μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί όχι μόνο να αναγνωρίζει αυτά τα σφάλματα αλλά και να τα διορθώνει. Όμως υπάρχουν φορές που δεν μπορεί το κύτταρο να αναγνωρίσει αυτές τις αλλαγές και η συσσώρευση διαφόρων τέτοιων γενετικών μεταλλάξεων μπορεί εν τέλη να οδηγήσει στην ανάπτυξη του καρκίνου [27].

Στην συνέχεια, θα επισημάνουμε τις αλλαγές που προκαλούν αυτές οι γενετικές μεταλλάξεις στην λειτουργία του κυττάρου. Πρώτα, η ομοιόσταση είναι ένας τρόπος του οργανισμού να διασφαλίζει ότι όλες οι διαδικασίες λειτουργούν σωστά. Άρα, για να διατηρηθεί η ομοιόσταση στον οργανισμό, τα υγιή κύτταρα σε περίπτωση που υποστούν κάποια ζημιά είτε θα γίνει επιδιόρθωση τους είτε θα προχωρήσουν στην απόπτωση τους. Από την άλλη, τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν αυτήν την δυνατότητα λόγω μεταλλάξεων στα ογκοκατασταλτικά γονίδια με αποτέλεσμα να μπορούν να συνεχίσουν να αναπαράγονται. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη p53 έχει την ιδιότητα να ελέγχει εάν τα κύτταρα έχουν υποστεί τόση ζημιά που θα πρέπει να αυτοκαταστραφούν. Επομένως, οι μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο πιθανότατα θα οδηγήσουν σε μειωμένη ή και μηδενική σύνθεση τις συγκεκριμένης πρωτεΐνης κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε καρκίνο. Επιπλέον, τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA αναζητούν για λάθη στο DNA του κυττάρου και εκτελούν τις απαραίτητες αλλαγές. Μια μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά τα γονίδια μπορεί να συνεπάγεται σε μη επιδιόρθωση των σφαλμάτων και η συσσώρευση αυτών να οδηγήσει σε καρκίνο. Γενικότερα, αυτές οι μεταλλάξεις είναι οι συνηθέστερες όμως υπάρχουν αρκετές ακόμη γονιδιακές μεταλλάξεις που μπορεί να συνεισφέρουν στην εμφάνιση καρκίνου [28].

1.2.3 Μέθοδοι αντιμετώπισης καρκίνου

Η πολυπλοκότητα του καρκίνου είναι τέτοια που είναι πολύ δύσκολο για τους επιστήμονες να καταλήξουν σε μια θεραπεία η οποία να μπορεί να αντιμετωπίσει όλους τους τύπους καρκίνου. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι ακόμα και δύο άνθρωποι με την ίδια μορφή καρκίνου πιθανότατα να χρειαστούν και διαφορετικές θεραπείες. Στην εικόνα 7 μπορούμε να παρατηρήσουμε μερικές από τις βασικότερες μεθόδους θεραπείας του καρκίνου. Όμως, μπορεί να χρειαστεί και κάποια άλλη μέθοδος ή ένας συνδυασμός τους, ανάλογα πάντα με τον κάθε ασθενή και τον τύπο καρκίνου που έχει.



Εικόνα 7- Διαφορετικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση του καρκίνου

Πιο συγκεκριμένα οι τρόποι αντιμετώπισης του καρκίνου είναι :

- **Ορμονοθεραπεία:** Χρησιμοποιείται συνήθως για καρκίνους που συνδέονται με τις ορμόνες, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του προστάτη για τους άντρες και ο καρκίνος του μαστού για τις γυναίκες. Η συγκεκριμένη θεραπεία παρεμποδίζει την ικανότητα του οργανισμού να παράγει τις ορμόνες και άλλες ουσίες που καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο θα λειτουργούν αυτές στο σώμα μας [29].

- **Χειρουργείο:** Αφορά στερεούς όγκους και η προσέγγιση που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το σημείο του σώματος που υπάρχει ο όγκος και η ποσότητα ιστού που θα χρειαστεί να αφαιρεθεί. Δεν γίνεται χρήση χειρουργείου σε περιπτώσεις που αφορούν αιματολογικούς καρκίνους ή καρκίνους στους οποίους έγινε μετάσταση [30].
- **Μεταμόσχευση μυελού των οστών:** Αποκαλείται επίσης μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και χρησιμοποιείται προκειμένου να αντιμετωπίσουμε καρκίνους του αίματος όπως η λευχαιμία, το μυέλωμα και το λέμφωμα, οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή και την λειτουργία των κυττάρων του αίματος [31].
- **Χημειοθεραπεία:** Στόχος της χημειοθεραπείας είναι η χρήση ενός ή πολλαπλών φαρμάκων έτσι ώστε να σταματήσει ή έστω να καθυστερήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ένα μειονέκτημα της συγκεκριμένης θεραπείας είναι ότι επηρεάζει την ανάπτυξη όχι μόνο των καρκινικών κυττάρων αλλά και των υγιών με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αρκετές παρενέργειες στον ασθενή όπως αίσθημα κόπωσης, αλωπεκία, ναυτία και αιματολογική τοξικότητα [32].
- **Ραδιοθεραπεία:** Η ραδιοθεραπεία χρησιμοποιεί υψηλές δόσεις ακτινοβολίας και στοχεύει μια συγκεκριμένη περιοχή του σώματος με αποτέλεσμα να εξολοθρεύσει όλα τα υγιή και καρκινικά κύτταρα, βλάπτοντας το DNA τους. Δεν ενδείκνυται η χρήση ραδιοθεραπείας για μεταστατικούς καρκίνους καθώς το να εκτεθούν πολλαπλά μέρη του σώματος στην ακτινοβολία θα είχε αρνητικές συνέπειες για την υγεία του ασθενή [33].
- **Ανοσοθεραπεία:** Η λογική πίσω από αυτήν την μέθοδο είναι ότι πλέον δεν στοχεύουμε άμεσα τον καρκίνο, αλλά σκοπός είναι να εκπαιδύσουμε το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς έτσι ώστε ο ίδιος να τον καταπολεμήσει. Πιο συγκεκριμένα, το ανοσοποιητικό μας σύστημα έχει την ικανότητα να εντοπίζει και να εξολοθρεύει κύτταρα τα οποία έχουν μια αποκλίνουσα συμπεριφορά. Όμως, τα καρκινικά κύτταρα λόγω διαφόρων μεταλλάξεων να μην είναι ορατά από το ανοσοποιητικό ή να περιέχουν

πρωτεΐνες οι οποίες απενεργοποιούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού θα οδηγήσει στην καλύτερη αντιμετώπιση του καρκίνου [34].

Επιπλέον, έχουμε την δυνατότητα να διακρίνουμε 3 είδη θεραπειών εάν θέσουμε ως κριτήριο σύγκρισης τον στόχο τους [35]:

- **Βασική θεραπεία:** Σκοπός της συγκεκριμένης θεραπείας είναι η πλήρης εξάλειψη όλων των καρκινικών κυττάρων από το σώμα του ασθενούς. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί έχουμε την δυνατότητα να εφαρμόσουμε οποιαδήποτε μέθοδο με την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη να είναι το χειρουργείο.
- **Συμπληρωματική θεραπεία:** Ως στόχο έχει να εξοντώσει τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα αμέσως μετά την βασική θεραπεία με αποτέλεσμα να μειωθεί ο κίνδυνος υποτροπής του καρκίνου. Οι συχνότερες μέθοδοι σε αυτό το είδος θεραπείας είναι η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η ορμονοθεραπεία.
- **Καταπραϋντική θεραπεία:** Η συγκεκριμένη θεραπεία συνήθως πραγματοποιείται παράλληλα με τις άλλες δύο και έχει ως στόχο να ανακουφίσει τον ασθενή από τις επίπονες και ανεπιθύμητες παρενέργειες τις κάθε θεραπείας ή από τα συμπτώματα που προκαλεί ο ίδιος ο καρκίνος.

Όπως μπορούμε να αντιληφθούμε η δυσκολία που υπάρχει στο να βρεθεί θεραπεία για όλους τους τύπους καρκίνου που υπάρχουν, στρέφει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Όσο πιο νωρίς εντοπισθεί ο καρκίνος σε έναν άνθρωπο τόσο μεγαλύτερες είναι και οι πιθανότητες για την επιτυχή αντιμετώπισή του.

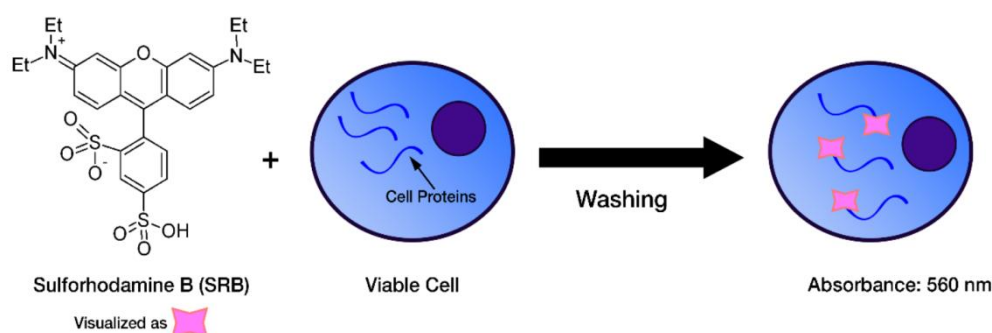
1.3. Μέθοδοι μέτρησης κυτταρικής βιωσιμότητας

Ο προσδιορισμός της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας αποτελεί σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη των επιλογών θεραπείας για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Προτού γίνει η πραγματοποίηση των *in vivo* πειραμάτων, δηλαδή των πειραμάτων που εκτελούνται σε έναν ζωντανό οργανισμό, είναι ζωτικής σημασίας ο υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας, όπως για παράδειγμα μια χημική ένωση, να πραγματοποιηθούν ορισμένα *in vitro* πειράματα για την αξιολόγηση της δυνητικής του αντικαρκινικής δράσης. Τα *in vitro* αυτά πειράματα, πραγματοποιούνται έξω από τους ζωντανούς οργανισμούς και οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος γίνονται κάτω από απόλυτα ελεγχόμενα συνθήκες. Συνήθως, για την διερεύνηση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων μιας χημικής ένωσης χρησιμοποιούνται καρκινικά κύτταρα στα οποία ελέγχονται διάφορα χαρακτηριστικά όπως η κυτταρική βιωσιμότητα και ο τρόπος προέλευσης του κυτταρικού θανάτου, όπως η μέτρηση διαφόρων πρωτεϊνών (κασπάσες) οι οποίες σχετίζονται με την απόπτωση ή ο έλεγχος των σημείων που διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος [36]. Ύψιστης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά πρέπει να ελέγχονται και σε υγιείς κυτταρικές σειρές. Το επιθυμητό αποτέλεσμα θα είναι ο υπό δοκιμή παράγοντας να αντιμετωπίζει με αντίθετο τρόπο τις υγιείς σειρές απ' ότι τις καρκινικές. Πιο συγκεκριμένα, είναι σημαντικό να μην επιδρά αρνητικά στην κυτταρική βιωσιμότητα των υγιών κυττάρων, ενώ παράλληλα να καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η επιλεκτικότητα της χημικής ένωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση της σοβαρότητας των παρενεργειών που σχετίζονται με τη χρήση των φαρμάκων [37].

Οι μέθοδοι μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των υγιών κυττάρων σε έναν πληθυσμό ή του ρυθμού ανάπτυξης ενός πληθυσμού κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την μέτρηση δεικτών της κυτταρικής δραστηριότητας, όπως η μεταβολική δραστηριότητα, ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν, η παραγωγή ATP ή η σύνθεση του DNA. Συχνά αυτές οι παράμετροι μετρούνται μέσω χρωματομετρικών ή δεσμευτικών μεθόδων [36]. Μερικές από τις κυριότερες μεθόδους μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας αναφέρονται παρακάτω.

1.3.1 Μέθοδος SRB

Η μέθοδος sulforhodamine B (SRB) ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1990 και πρόκειται για μια γρήγορη, ευαίσθητη και οικονομική μέθοδο η οποία μας παρέχει την δυνατότητα να διερευνήσουμε τον πληθυσμό των κυττάρων [38]. Το SRB είναι ένα αμινοξανθένιο και όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, έχει ένα ανοικτό ροζ χρώμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα δέσμευσης της χημικής ένωσης SRB, κάτω από ήπιες όξινες συνθήκες, στα αμινοξέα των κυτταρικών πρωτεϊνών και η χρωματομετρική αξιολόγηση μας παρέχει πληροφορίες της συνολικής μάζας των πρωτεϊνών, η οποία έχει άμεση συσχέτιση με τον αριθμό των κυττάρων [39].



Εικόνα 8-Τρόπος δράσης της SRB μεθόδου. Η χημική ένωση SRB η οποία έχει το χαρακτηριστικό ροζ χρώμα δεσμεύεται στις πρωτεΐνες των κυττάρων αντικατοπτρίζοντας με τον τρόπο αυτόν τον αριθμό των κυττάρων [40].

Όσο περισσότερα πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η σύνθεση των πρωτεϊνών και άρα θα δεσμεύεται και μεγαλύτερη ποσότητα SRB. Συνεπώς, η ένταση του χρώματος συσχετίζεται άμεσα με τον πληθυσμό των κυττάρων. Αν για παράδειγμα, καρκινικά κύτταρα στα οποία έχει γίνει επώαση με ένα αντικαρκινικό φάρμακο, παρουσιάσουν έντονο ροζ χρώμα αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και πιθανότατα έχουν ανθεκτικότητα στο εν λόγω φάρμακο. Από την άλλη, εάν στο δείγμα μας παρατηρούμε ένα ανοικτό ροζ χρώμα αυτό υποδηλώνει ότι δεσμεύτηκε μικρή ποσότητα SRB και άρα το φάρμακο

εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Με την χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου, έχουμε την δυνατότητα να εκτελέσουμε αναλύσεις που αφορούν την κυτταρική βιωσιμότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξικότητα.

Το διάλυμα SRB δεν είναι φωτοευαίσθητο, επομένως τα τρυβλία δεν χρειάζεται να είναι καλυμμένα κατά την επώαση. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθείται προκειμένου να γίνει η συγκεκριμένη ανάλυση είναι [41]:

- Στρώση των κυττάρων σε τρυβλία με 96 κοιλότητες
- Έκθεση των κυττάρων στην υπό δοκιμή χημική ένωση που επιθυμούμε. Ο χρόνος επώασης θα εξαρτηθεί από τον τύπο της ένωσης που δοκιμάζεται και πρέπει να προσδιοριστεί πειραματικά
- Προσθήκη του διαλύματος SRB σε κάθε κοιλότητα για το χρονικό διάστημα της 1 ώρας
- Μέτρηση της απορρόφησης στα 510-565 nm

Για να γίνει ο υπολογισμός του ποσοστού της κυτταρικής ανάπτυξης αρκεί να χρησιμοποιηθεί ο παρακάτω τύπος [41]:

$$\% \text{ κυτταρικής ανάπτυξης} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση δείγματος ελέγχου}} \times 100$$

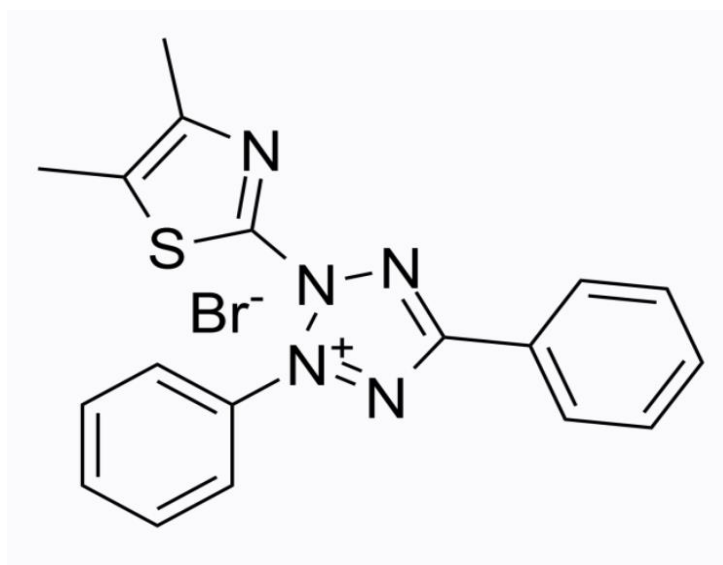
Επιπλέον, για να υπολογίσουμε το ποσοστό της αναστολής της ανάπτυξης ακολουθούμε τον εξής τύπο:

$$\% \text{ αναστολής της ανάπτυξης} = 100 - \% \text{ κυτταρικής ανάπτυξης}$$

Οι στατιστικές δοκιμές για αυτόν τον τύπο ανάλυσης μπορούν να περιλαμβάνουν τεστ t για συγκρίσεις δύο ομάδων ή ANOVA για συγκρίσεις πολλαπλών ομάδων.

1.3.2 Μέθοδος MTT

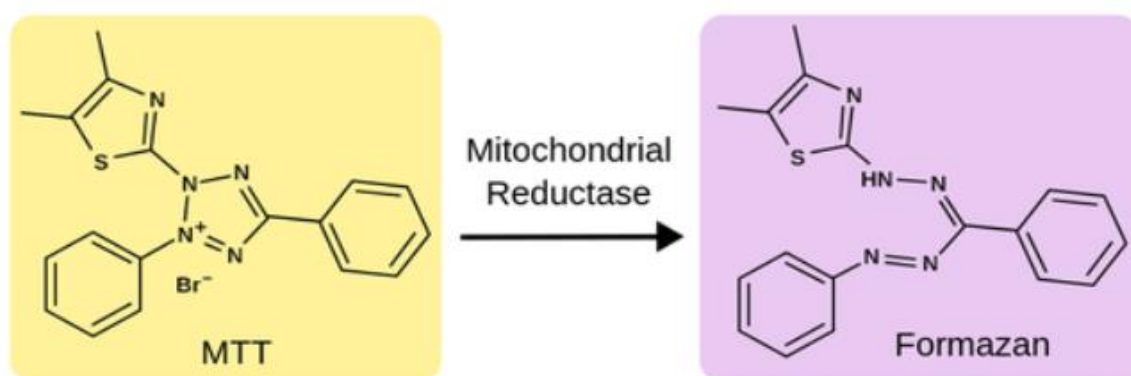
Η συγκεκριμένη μέθοδος κατατάσσεται στις μεθόδους μέτρησης της μεταβολικής δραστηριότητας. Τα άλατα τετραζολίου χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιστοχημεία προκειμένου να γίνει αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Το πιο γνωστό άλας τετραζολίου είναι το 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) το οποίο έχει ένα ανοιχτό κίτρινο χρώμα, Εικόνα 9.



Εικόνα 9- Χημικός τύπος του άλατος τετραζολίου MTT

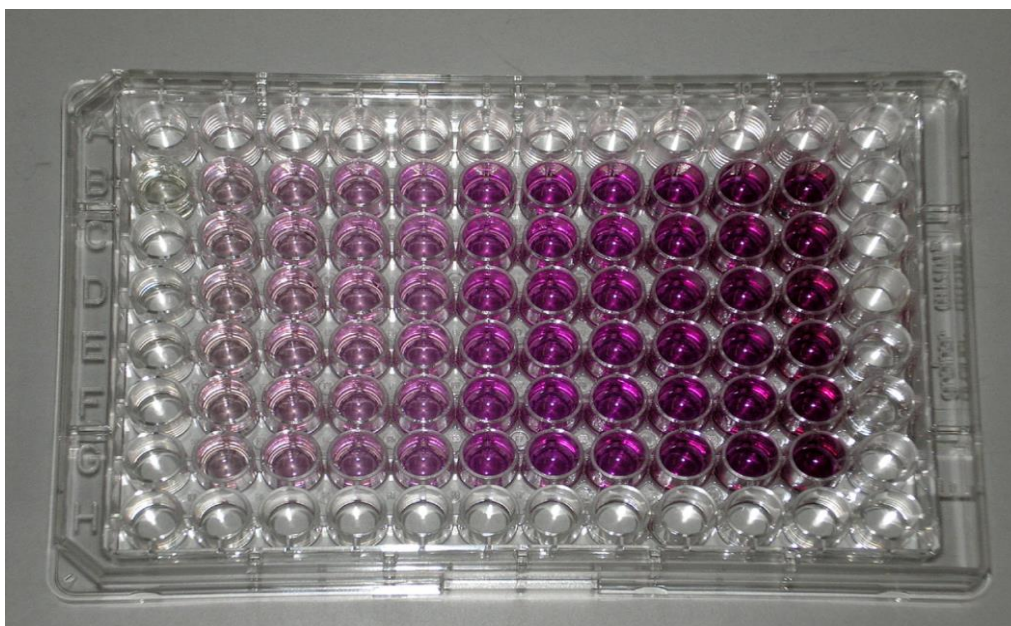
Η χρωματομετρική μέθοδος MTT αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1983 και πρόκειται για μια γρήγορη και ακριβής μέθοδο η οποία έχει την δυνατότητα να μετρήσει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων [42]. Τα μιτοχονδριακά ένζυμα οξειδοαναγωγής, που ονομάζονται αφυδρογονάσες, έχουν την ικανότητα να

αντικατοπτρίζουν τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων καθώς μια κατάσταση κυτταρικής οξειδοαναγωγής είναι απαραίτητη για την βιοσύνθεση και την αντιοξειδωτική άμυνα [43]. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά έχουν μπορούν να ανάγουν την χρωστική τετραζολίου MTT, στην αδιάλυτη φορμαζάνη, η οποία έχει ένα χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται και στην εικόνα 10.



Εικόνα 10- Το MTT (κίτρινο χρώμα) μετατρέπεται στην φορμαζάνη του (μωβ χρώμα) μέσω της μιτοχονδριακής αναγωγής [44]

Η απορρόφηση του έγχρωμου διαλύματος μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με την μέτρηση σε ένα ορισμένο μήκος κύματος, από 500 έως 600nm, με την χρήση ενός φασματοφωτόμετρου. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της φορμαζάνης τόσο πιο έντονο θα είναι το μωβ χρώμα και άρα μεγαλύτερη θα είναι και η απορρόφηση. Γενικότερα, όπως προαναφέραμε, η αναγωγή του MTT εξαρτάται από την κυτταρική μεταβολική δραστηριότητα που οφείλεται στις αφυδρογονάσεις. Επομένως, κύτταρα με χαμηλό μεταβολισμό θα ανάγουν μικρή ποσότητα MTT. Από την άλλη, κύτταρα τα οποία διαιρούνται με γρήγορους ρυθμούς, παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αναγωγής MTT, το οποίο μεταφράζεται σε μεγάλη συγκέντρωση φορμαζάνης και επομένως θα παρατηρούμε ένα έντονο μωβ χρώμα, εικόνα 11 [45].



Εικόνα 11- Κύτταρα στρωμένα σε ένα τρυβλίο με 96 κοιλοότητες μετά την εφαρμογή της μεθόδου MTT. Από αριστερά παρατηρούμε κύτταρα τα οποία έχουν χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι ο παράγοντας που εισήχθη μειώνει σε σημαντικό βαθμό την βιωσιμότητα των κυττάρων. Προς τα δεξιά, τα κύτταρα έχουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και ανάγουν σε μεγάλο ποσοστό το MTT. Σε αυτήν την περίπτωση ο παράγοντας δεν έχει δράσει αποτελεσματικά [45].

Εν αντιθέσει του διαλύματος SRB, η μέθοδος MTT πραγματοποιείται στο σκοτάδι, καθώς το αντιδραστήριο MTT είναι ευαίσθητο στο φως [46]. Το πρωτόκολλο για την μέθοδο MTT περιλαμβάνει συνοπτικά τα εξής βήματα [44]:

- Στρώση των κυττάρων σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων
- Επώση των κυττάρων για 24 ώρες έτσι ώστε να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες
- Εισαγωγή του δοκιμαζόμενου φαρμάκου για τον χρόνο επώσης που επιθυμούμε
- Προσθήκη του διαλύματος MTT για 2 ώρες στους 37 °C και μέχρις ότου εμφανιστούν οι πρώτες μωβ κηλίδες
- Καταμέτρηση της απορρόφησης στα 570 nm

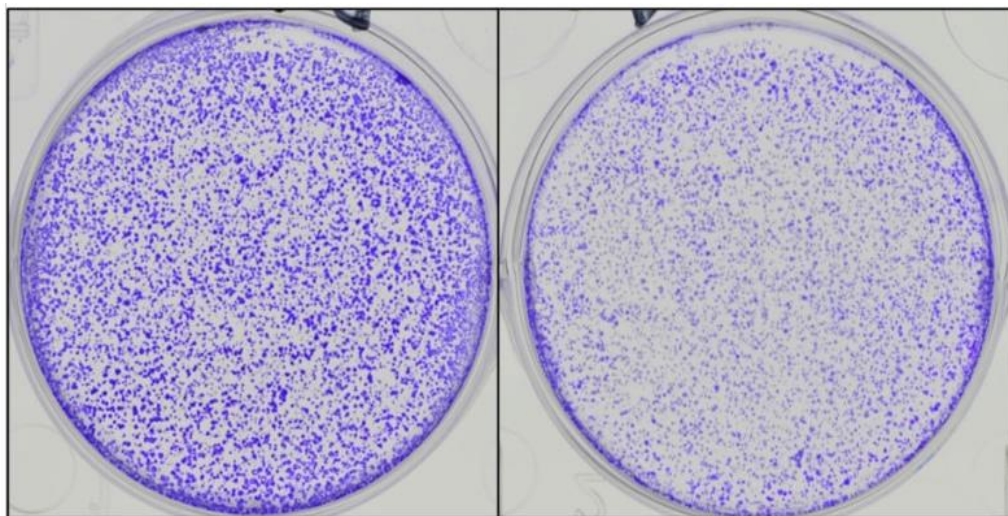
Τέλος, έχουμε την δυνατότητα να αντικαταστήσουμε το διάλυμα MTT με κάποια άλλα άλατα τετραζολίου όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [45]:

Πίνακας 1. Πιθανά άλατα τετραζολίου για την αντικατάσταση του MTT, για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Συμπεριλαμβάνεται επιπλέον ο χημικός τύπος, καθώς και το χρώμα του άλατος πριν και μετά την αναγωγή του.

Άλας τετραζολίου	Χημικός τύπος	Χρώμα διαλύματος	Χρώμα φορμαζάνης
XTT	(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)	Κίτρινο	Πορτοκαλί
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)	Άχρωμο	Μωβ
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium	Κίτρινο	Πορτοκαλί
CCK-8 (WST-8)	(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)	Άχρωμο	Πορτοκαλί

1.3.3. Crystal Violet μέθοδος

Η μέθοδος Crystal Violet (CV), είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος κατάλληλη για διερεύνηση της δράσης διαφόρων χημικοθεραπευτικών και άλλων παραγόντων στην ανάπτυξη και την επιβίωση μιας κυτταρικής καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να παραμένουν προσκολλημένα στην πλάκα. Κατά τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο αποκολλάτε και μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί από τον ζωντανό πληθυσμό. Η χρώση που χρησιμοποιείται δεσμεύεται από το DNA των κυττάρων προσδίδοντας με αυτόν τον τρόπο μια χαρακτηριστική έντονη μωβ χρώση, εικόνα 12.



Εικόνα 12- Οπτικό αποτέλεσμα του τρόπου δράσης της μεθόδου Crystal Violet. Στην εικόνα αριστερά φαίνεται το δείγμα ελέγχου όπου το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας βρίσκεται στο μέγιστο. Ενώ στην εικόνα δεξιά έχει γίνει η εισαγωγή του παράγοντα αναστολής, ο οποίος όπως φαίνεται από την ένταση της μωβ χρώσης, έχει εμφανώς μειώσει την κυτταρική ανάπτυξη [47].

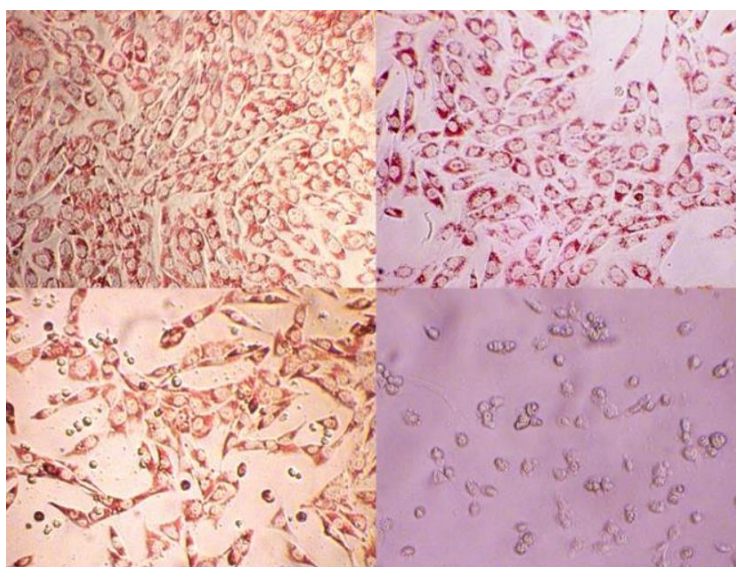
Επειδή η χρώση δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα θα χρειαστεί να προηγηθεί μια πλύση προκειμένου να απομείνουν μόνο τα ζωντανά προσκολλημένα κύτταρα. Συνεπώς, η παρουσία του μωβ χρωματισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα των βιώσιμων προσκολλημένων κυττάρων. Συνοπτικά το πρωτόκολλο που ακολουθείται για αυτήν την μέθοδο είναι το εξής:

- Στρώση των κυττάρων σε τρυβλία 96 κοιλοτήτων
- Επώση των κυττάρων με την χημική ένωση που επιθυμούμε στις επιθυμητές συνθήκες
- Προσθήκη της χρωστικής Crystal Violet
- Εκτελούμε πλύση με νερό για τέσσερις φορές
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 570 nm

Θα χρειαστεί, όπως και σε κάθε μέθοδο, να εκτελέσουμε τουλάχιστον 3 ανεξάρτητα πειράματα και να υπολογίσουμε τον μέσο όρο αυτών έτσι ώστε να έχουμε μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων [48].

1.3.4. Μέθοδος Neutral red uptake

Η μέθοδος Neutral red uptake (NRU) μας παρέχει μια ποσοτική εκτίμηση των βιώσιμων κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βιώσιμων κυττάρων να ενσωματώνουν και να δεσμεύουν την ουδέτερη κόκκινη χρώση (Neutral red: 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). Η χρώση αυτή διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας παθητικής διάχυσης και συγκεντρώνεται στα λυσοσώματα, όπου δεσμεύεται στις ανιονικές θέσεις τις λυσοσωμικής μήτρας. Καθώς το κύτταρο αρχίζει να πεθαίνει, η ικανότητα του να απορροφά την χρώση ελαττώνεται. Συνεπώς, η μειωμένη πρόσληψη του ουδέτερου κόκκινου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Επιπλέον, ανάλογα με το ποσοστό αφομοίωσης της συγκεκριμένης χρωστικής έχουμε την δυνατότητα να διακρίνουμε τα βιώσιμα από τα κατεστραμμένα και τα νεκρά κύτταρα.



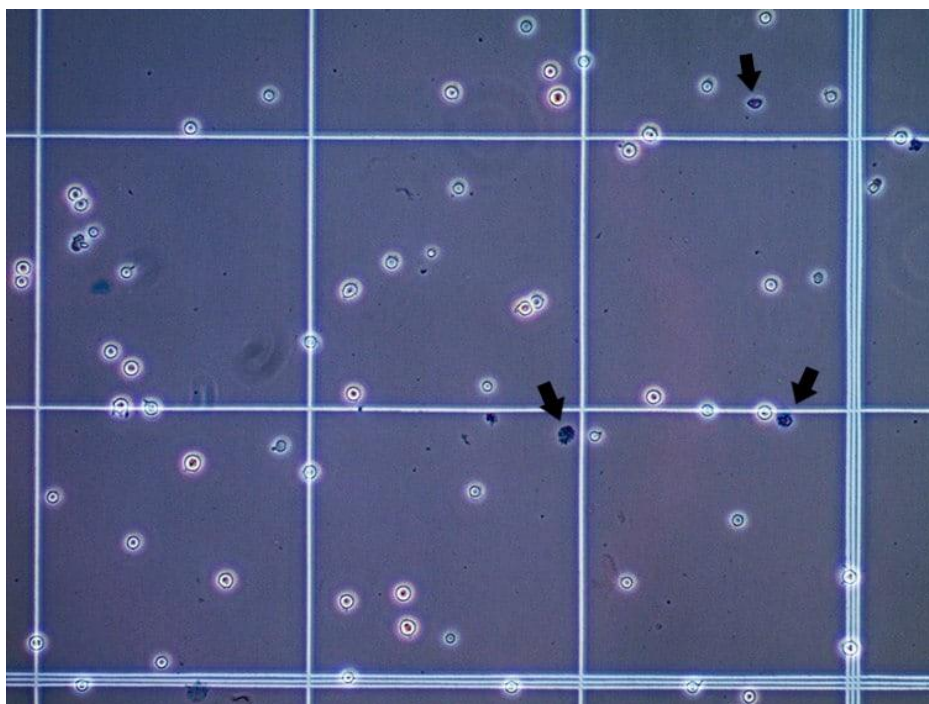
Εικόνα 12- Κύτταρα στα οποία έχει εφαρμοστεί η NRU μέθοδος προκειμένου να διερευνηθεί η κυτταρική τους βιωσιμότητα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας το οποίο είναι ανάλογο με την ένταση και την συχνότητα του ουδέτερου κόκκινου, είναι μεγαλύτερο στις δύο πάνω φωτογραφίες σε σχέση με τις δύο κάτω [49].

Αυτή η μέθοδος είναι πιο φθηνή και πιο ευαίσθητη σε σχέση με άλλες μεθόδους μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπως οι μέθοδοι που βασίζονται στα άλατα τετραζόλιου ή στην μέτρηση πρωτεϊνών και ενζύμων. Μόλις γίνει η στρώση και η

επεξεργασία των κυττάρων, η NRU μέθοδος δύναται να ολοκληρωθεί σε λιγότερο από 3 ώρες. Επιπλέον, η πρόσληψη του ουδέτερου κόκκινου, μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, θα χρειαστεί να ποσοτικοποιηθεί με την χρήση ενός φασματοφωτόμετρου στα 540 nm [50].

1.3.5. Trypan blue μέθοδος

Ακόμα μια μέθοδος η οποία έχει την ικανότητα να ποσοτικοποιήσει την βιωσιμότητα των κυττάρων είναι η Trypan blue. Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα των βιώσιμων κυττάρων να διαθέτουν ανέπαφες τις κυτταρικές τους μεμβράνες και έτσι να μην επιτρέπουν σε ορισμένες ουσίες, όπως είναι το κυανό του τρυπανίου που χρησιμοποιεί αυτή η μέθοδος, να μην εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα υγιή κύτταρα να μην έχουν χρωματιστεί από αυτήν την χαρακτηριστική μπλε χρώση. Από την άλλη, ένα μη βιώσιμο κύτταρο του οποίου η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί βλάβη, θα απορροφήσουν την χρωστική και το κυτταρόπλασμά τους θα παρουσιάζεται με μια μπλε χρώση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.

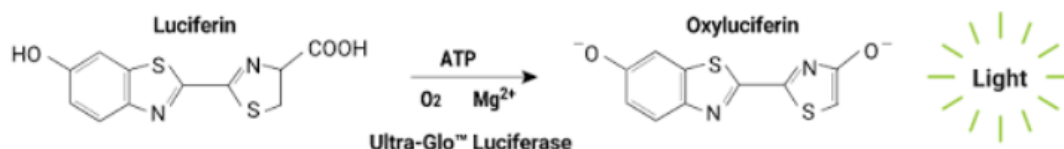


Εικόνα 13- Το αποτέλεσμα της εφαρμογής της μεθόδου Trypan blue. Με τα βελάκια έχουν σημειωθεί τα νεκρά κύτταρα, δηλαδή αυτά τα οποία έχουν σημειωθεί από την μπλε χρώση η οποία έχει διαπεράσει την κυτταρική τους μεμβράνη. Τα υπόλοιπα κύτταρα που δεν έχουν αυτό το χαρακτηριστικό χρώμα λογίζονται ως βιώσιμα [51].

Παρόλο που είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Ένα από αυτά αφορά την συσχέτιση που έχει η κυτταρική βιωσιμότητα με την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, το κύτταρο μπορεί να υποστεί μια προσωρινή βλάβη στην κυτταρική του μεμβράνη την οποία έχει την δυνατότητα να επιδιορθώσει και να καταστεί αμέσως πλήρως βιώσιμο. Όμως, το χρονικό διάστημα αυτής της βλάβης η χρωστική αυτής της μεθόδου θα έχει την δυνατότητα να εισχωρήσει στο κύτταρο και να το σημάνει με μπλε χρώση και επομένως να θεωρηθεί ως μη βιώσιμο [52].

1.3.6. Μέθοδος εντοπισμού ATP

Μια ακόμη τεχνική για την ανάλυση της κυτταρικής βιωσιμότητας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της παραγωγής ATP (Adenosine triphosphate). Γενικότερα, τα ATP είναι μόρια τα οποία διατηρούν την ενέργεια που πρόκειται να απαιτηθεί από το κύτταρο για ορισμένες βιολογικές διεργασίες. Μετά τον κυτταρικό θάνατο η διαδικασία παραγωγής ATP σταματάει και οι ενδογενής ATPάσες θα αποικοδομήσουν το υπάρχον ATP. Η μέθοδος βιοφωταύγειας χρησιμοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση, το οποίο καταλύει τον σχηματισμό φωτός (οξυλουσιφερίνη) από το ATP και την λουσιφερίνη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14. Επομένως, τα επίπεδα ATP έχουν άμεση συσχέτιση με την ποσότητα της εκπομπής φωτός. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί στη συνέχεια να συσχετιστεί με μια αύξηση της συνολικής ποσότητας ATP που παράγεται σε έναν πληθυσμό εκθετικά αναπτυσσόμενων κυττάρων [53].

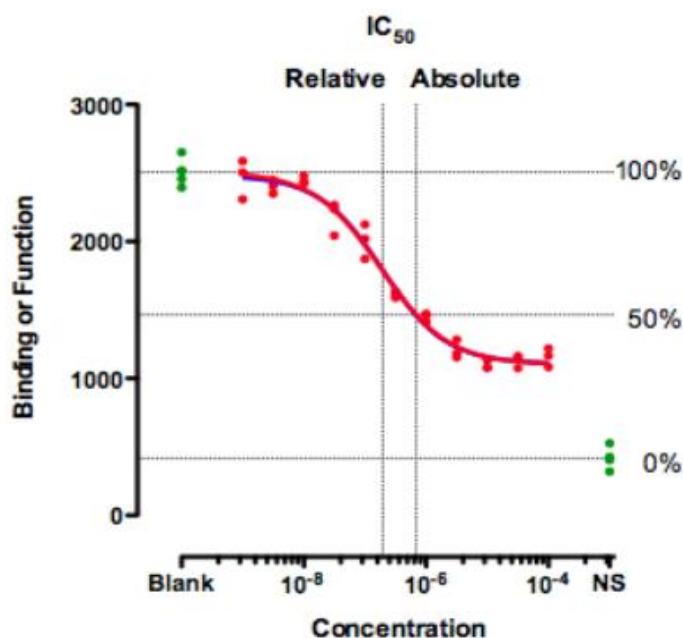


Εικόνα 14- Διαδικασία παραγωγής φωτός σύμφωνα με την μέθοδο βιοφωταύγειας που βασίζεται στην παραγωγή των ATP [54].

1.4. Μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀)

Η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση [half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)] είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέτρα στην φαρμακευτική βιομηχανία, το οποίο μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου. Μέσω του συγκεκριμένου μέτρου μπορούμε να διαπιστώσουμε ποια είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται προκειμένου να αναστείλει μια βιολογική διεργασία κατά το ήμισυ, παρέχοντας έτσι ένα μέτρο δραστηριότητας του φαρμάκου σε μια φαρμακευτική έρευνα [55].

Ωστόσο, εντοπίζουμε ορισμένες περιπτώσεις όπου χρειάζεται να ξεχωρίσουμε δύο μορφές με τις οποίες μπορεί να αναπαρασταθεί ο δείκτης IC₅₀, όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Αυτό συμβαίνει όταν η μέγιστη δραστηριότητα της δοκιμαστικής ουσίας δεν συμπίπτει με την μέγιστη τιμή που έχει το δείγμα ελέγχου.



Εικόνα 15- Απεικόνιση των δύο διαφορετικών τρόπων υπολογισμού του δείκτη IC₅₀. Τα πράσινα στίγματα αναπαριστούν τις μετρήσεις που έγιναν με τα δείγματα ελέγχου, όπου στα αριστερά εφόσον δεν υπάρχει αναστολή της βιολογικής δραστηριότητας σημαίνει ότι τα δείγματα περιέχουν μηδενική συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας. Ενώ, τα πράσινα στίγματα στην δεξιά πλευρά αφορούν αποτελέσματα για τα οποία έγινε χρήση μια άλλης χημικής ουσίας, η οποία γνωρίζουμε ότι έχει την δυνατότητα να παράγει το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα [56].

Από την μια, το **απόλυτο** IC50 ορίζεται ως την συγκέντρωση η οποία θα επιφέρει μείωση κατά το ήμισυ μεταξύ των δύο ορίων που ορίζουν τα δείγματα ελέγχου. Επειδή στα δείγματα ελέγχου η μέγιστη και η ελάχιστη αναστολή είναι 0% και 100%, αντιστοίχως, τότε αρκεί να βρούμε ποια είναι η συγκέντρωση που θα μας δώσει την αναστολή της βιολογικής διαδικασίας που μελετάμε στο 50%. Από την άλλη, το **σχετικό** IC50 δεν λαμβάνει υπόψιν τις τιμές των δειγμάτων ελέγχου παρά μόνον αυτές που μας παρέχει η δοκιμαστική ουσία. Συνεπώς, για τον υπολογισμό του σχετικού IC50 αρκεί να εντοπίσουμε την συγκέντρωση που θα έχει ως αποτέλεσμα να μειώσει την βιολογική διαδικασία στο ήμισυ μεταξύ μέγιστης και ελάχιστης δράσης. Στις περιπτώσεις όπου η μέγιστη και η ελάχιστη δράση μιας ένωσης ταυτίζεται με αυτές των δειγμάτων ελέγχου, τότε η έννοιες του απόλυτου και σχετικού IC50 συμπίπτουν [56].

Ένας κοινός τρόπος για να ορίσουμε το μέτρο IC50 είναι να χρησιμοποιηθεί ένα μαθηματικό μοντέλο που θα περιλαμβάνει μια παράμετρο η οποία το ορίζει άμεσα. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου μοντέλου είναι το λογιστικό μοντέλο 4 παραμέτρων [4-parameter logistic model (4-PL)], το οποίο περιγράφει το μοτίβο της σιγμοειδούς απόκρισης. Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται προκειμένου να περιγράψει το παραπάνω μοντέλο είναι ο εξής:

$$Y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b}$$

Όπου το X είναι η συγκέντρωση της χημικής ένωσης που δοκιμάζουμε και Y είναι η απόκριση που έχει η συγκεκριμένη συγκέντρωση. Το a ορίζεται ως την τιμή της ελάχιστης δράσης που έχει μια ουσία, εφόσον μελετάμε την αναστολή μιας λειτουργίας. Το d λαμβάνει την τιμή της μέγιστης απόκρισης, ενώ η παράμετρος c είναι η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην μέση απόκριση μεταξύ a και d. Τέλος, το b είναι ένας συντελεστής κλίσης που περιγράφει την κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης [57].

1.5. Μετα-ανάλυση

Στην σημερινή εποχή η ολοένα και αυξανόμενη παραγωγή δεδομένων σε διάφορους τομείς καθιστά επιτακτική την ανάγκη της συλλογής των αποτελεσμάτων που προέρχονται από την πληθώρα των ερευνών που διεξάγονται. Για τον λόγο αυτόν έχει δημιουργηθεί η έννοια της μετα-ανάλυσης. Η μετα-ανάλυση είναι μια στατιστική διαδικασία που συνδυάζει τα δεδομένα πολλαπλών ανεξάρτητων μελετών για την εξεύρεση ενός καθολικού αποτελέσματος. Το συγκεντρωτικό αυτό αποτέλεσμα στην ουσία είναι ένας σταθμισμένος μέσος όρος των επιμέρους μελετών. Αυτό που επιτυγχάνεται μέσω της μετα-ανάλυσης είναι ότι καταφέρνει να απαντήσει σε μια επιστημονική υπόθεση με μεγαλύτερη εγκυρότητα και ακρίβεια, σε σχέση με κάθε επιμέρους μελέτη ξεχωριστά. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι μια συστηματική ανασκόπηση πρέπει πάντα να προηγείται της μετα-ανάλυσης καθώς πρόκειται για δύο διαδικασίες αλληλένδετες και μόνον ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα [58].

Μέσω της μετα-ανάλυσης αυξάνεται η στατιστική ισχύς καθώς δημιουργεί ένα αποτέλεσμα το οποίο προκύπτει από πολλαπλές έρευνες. Ακόμη, ένα πολύ συχνό φαινόμενο είναι ότι ανάμεσα στις μελέτες υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα κάτι το οποίο μέσω της μετα-ανάλυσης δύναται να βρεθεί μια κοινή αλήθεια η οποία θα εξαλείψει την αβεβαιότητα. Τέλος, ένα ακόμη πλεονέκτημα της μετα-ανάλυσης είναι το γεγονός ότι έχει την δυνατότητα να απαντάει σε ερωτήματα που μπορεί να μην τέθηκαν σε μια μεμονωμένη μελέτη αλλά και να μας κατευθύνει σχετικά με τις ελλείψεις και τις ανάγκες που υπάρχουν ώστε να γνωρίζει η επιστημονική κοινότητα που θα πρέπει να εναποθέσει την προσοχή της [59].

Συγκεντρωτικά, η ουσία της μετα-ανάλυσης είναι να ληφθεί μια ενιαία εκτίμηση της επίδρασης που μας ενδιαφέρει (μέγεθος επίδρασης), μέσω μαθηματικών και στατιστικών μοντέλων, που παρατηρούνται σε καθεμία από τις πολλές παρόμοιες μελέτες. Όλες οι μέθοδοι μετα-ανάλυσης εκτιμούν το συνολικό αποτέλεσμα υπολογίζοντας έναν σταθμισμένο μέσο όρο των μεμονωμένων μεγεθών επίδρασης των μελετών.

1.6. Σκοπός παρούσας ερευνητικής εργασίας

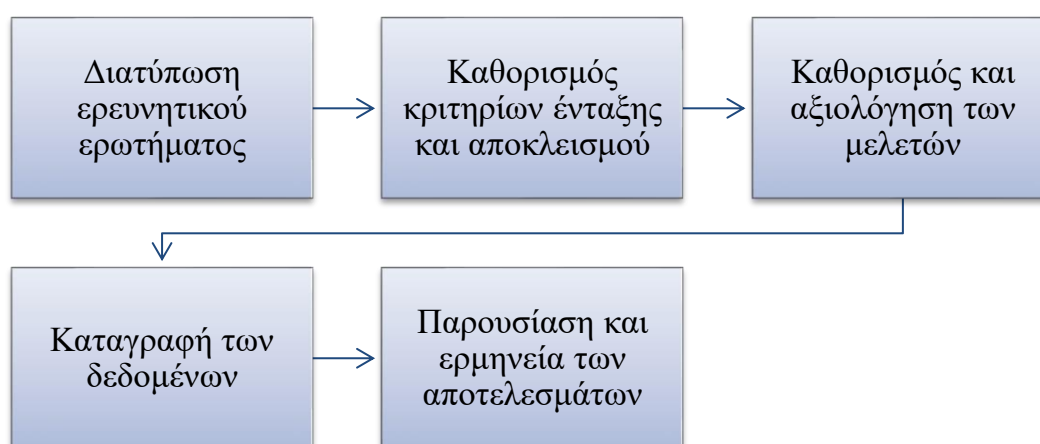
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η δράση όλων των χημικών ενώσεων του λυκίσκου σε ασθένειες που σχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου χρησιμοποιώντας όλα τα αποτελέσματα από τη διεθνή βιβλιογραφία. Έπειτα, συνθέτοντάς τα στατιστικά με την μέθοδο της μετα-ανάλυσης επιθυμούμε να συγκρίνουμε τις χημικές ενώσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να βρούμε αυτή με την ισχυρότερη ανασταλτική ιδιότητα, να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει κάποια μέθοδος η οποία είναι ικανή να παράγει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Επιπλέον, θέλουμε να εξετάσουμε μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ του χρόνου επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση και την ανασταλτική δράση καθώς επίσης και εάν οι χημικές ενώσεις του λυκίσκου έχουν την ικανότητα να είναι πιο αποτελεσματικές στα καρκινικά κύτταρα απ' ότι στα υγιή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συλλογή δεδομένων

2.1.1. Συστηματική ανασκόπηση

Η συστηματική ανασκόπηση, αποτελεί μια καλά σχεδιασμένη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, που βασίζεται αρχικά στην δημιουργία ενός επιστημονικού ερωτήματος με σκοπό την αναγνώριση των σχετικών ερευνών την αξιολόγησή τους, ώστε τελικώς να συμπεριληφθούν στην μετα-ανάλυση. Για μια επιτυχημένη συστηματική ανασκόπηση απαιτούνται 5 βήματα, τα οποία φαίνονται στο παρακάτω σχήμα και τα οποία πρόκειται να αναλυθούν στην συνέχεια [60,61].



Εικόνα 16- Απαιτούμενα βήματα για την περάτωση μιας συστηματικής ανασκόπησης

2.1.2. Διατύπωση ερευνητικού ερωτήματος

Η διατύπωση του ερευνητικού ερωτήματος είναι ύψιστης σημασίας και αποτελεί πρωταρχικό βήμα το οποίο πρόκειται να καθορίσει την μετέπειτα πορεία της συστηματικής ανασκόπησης. Στην ουσία για να δημιουργήσουμε αυτό το ερώτημα πρέπει να σκεφτούμε ποιο είναι το πρόβλημα το οποίο επιθυμούμε να επιλύσουμε. Η συγκεκριμενοποίηση του ερευνητικού ερωτήματος είναι επίσης σημαντική καθώς θα πραγματοποιηθεί μια πιο ορθή και εστιασμένη βιβλιογραφική αναζήτηση. Κατά την ολοκλήρωση της συστηματικής ανασκόπησης οι ερευνητές οφείλουν να ανατρέξουν στο συγκεκριμένο βήμα και να βεβαιωθούν ότι έχουν απαντήσει πλήρως το ερευνητικό ερώτημα που έθεσαν. Τα ερευνητικά ερωτήματα που θα επιχειρήσουμε να απαντήσουμε στην παρούσα εργασία αφορούν τα εξής:

- Κατέχουν οι χημικές ενώσεις του λυκίσκου αντικαρκινικές ιδιότητες;
- Ποια χημική ένωση έχει την πιο ισχυρή δράση;
- Ποιες χημικές ενώσεις έχουν την επιλεκτική ικανότητα ανάμεσα στις καρκινικές και τις κανονικές κυτταρικές σειρές;
- Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του δείκτη IC50 και του χρόνου επώασης των χημικών ενώσεων με την κυτταρική καλλιέργεια;
- Υπάρχει διαφοροποίηση όσον αφορά τα αποτελέσματα των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας;

2.1.3. Προσδιορισμός κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού μελετών

Εξίσου σημαντικό βήμα είναι ο προσδιορισμός των κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού μελετών. Ως πρωταρχικό κριτήριο πρέπει να θεωρηθεί η γλώσσα, καθώς σε περίπτωση που εντοπισθεί ένα άρθρο το οποίο έχει εκδοθεί σε μια γλώσσα πέραν της αγγλικής, τότε υπάρχει ο κίνδυνος εσφαλμένης μετάφρασης και αξιοποίησης των δεδομένων. Συνεπώς, η προτιμητέα γλώσσα για την επιλογή δημοσιεύσεων είναι η αγγλική. Το επόμενο κριτήριο έχει να κάνει με τον τύπο της

δημοσίευσης. Η προσοχή μας θα πρέπει να επικεντρώνεται μόνο στις πρότυπες αναφορές, ενώ παράλληλα θα πρέπει να αποφεύγουμε ανασκοπήσεις, περιλήψεις ή επιστολές, καθώς δεν μπορεί να γίνει επαρκής αξιολόγηση [62].

Περνώντας σε πιο ειδικά κριτήρια, στην παρούσα εργασία έχουμε επιλέξει να διερευνήσουμε την συσχέτιση που μπορεί να έχουν οι χημικές ενώσεις του λυκίσκου με αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συγκρίνοντας τον δείκτη IC50. Επομένως, θα χρειαστεί να συλλέξουμε μελέτες οι οποίες εκτελούν κάποιο *in vitro* πείραμα (πραγματοποίηση του πειράματος σε κυτταρική καλλιέργεια) και όχι πείραμα σε ζωντανό οργανισμό (*in vivo*). Ακόμη, θα χρειαστεί η μελέτη να μας παρέχει είτε ένα γράφημα μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπου θα διαφαίνεται η κάθε συγκέντρωση που εξετάζεται σε αντιστοιχία με το ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας που επιφέρει στην κυτταρική καλλιέργεια, είτε τον δείκτη IC50 που προκύπτει μετά από την περάτωση του συγκεκριμένου πειράματος. Τέλος, απαραίτητο κρίνεται το γεγονός ότι όλες οι χημικές ενώσεις πρέπει να έχουν ως κύρια πηγή προέλευσης τον λυκίσκο και όχι κάποιο άλλον φυτικό οργανισμό.

2.1.4. Καθορισμός και αξιολόγηση των μελετών

Πλέον περνάμε στην φάση της αναζήτησης και της αξιολόγησης των μελετών. Επομένως, είναι απαραίτητη η χρήση μιας ή περισσότερων βάσεων δεδομένων για την εξόρυξη των δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων ποικίλουν ανάλογα με το θέμα της έρευνας, όμως όσον αφορά τον κλάδο της βιοϊατρικής οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων είναι οι: PubMed, MEDLINE, Embase και Cochrane. Αφού γίνει επιλογή των βάσεων δεδομένων απαραίτητος είναι και ο σχεδιασμός της στρατηγικής αναζήτησης, σύμφωνα με τη Δυναδική γλώσσα [OR,AND,NOT]. Στο συγκεκριμένο βήμα θα χρειαστεί να εισάγουμε ένα ερώτημα στην βάση δεδομένων, το οποίο είναι ένας συνδυασμός λέξεων και συνώνυμων εκφράσεων που αντιπροσωπεύει επαρκώς το αντικείμενο της μελέτης μας. Με αυτόν τον τρόπο θα λάβουμε ως αποτέλεσμα όλες τις δημοσιεύσεις που απαντούν σε αυτό το ερώτημα που θέσαμε και θα ολοκληρώσουμε την βιβλιογραφική αναζήτηση.

Υστερα, αφού ελέγξουμε τα αποτελέσματα μας για πιθανόν διπλότυπες μελέτες, θα περάσουμε στο βήμα της αξιολόγησης. Είναι λογικό μέσα σε όλα αυτά τα αποτελέσματα να υπάρχουν και άρθρα τα οποία είναι εκτός του πεδίου ενδιαφέροντος μας. Γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητος ο έλεγχος όλων των τίτλων και των περιλήψεων προκειμένου να αφαιρέσουμε τα συγκεκριμένα άρθρα. Έπειτα, προχωράμε στην πλήρη ανάγνωση κάθε άρθρου ξεχωριστά και έχοντας υπόψιν τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού θα κατασταλάξουμε σε ποιες μελέτες πρόκειται να εντάξουμε στην ανασκόπηση και στην μετα-ανάλυση [63].

Τα βήματα της διαδικασίας αναζήτησης αλλά και αξιολόγησης της βιβλιογραφίας που περιεγράφηκαν συνοψίζονται σε ένα διάγραμμα ροής PRISMA-2009 flow diagram [64].

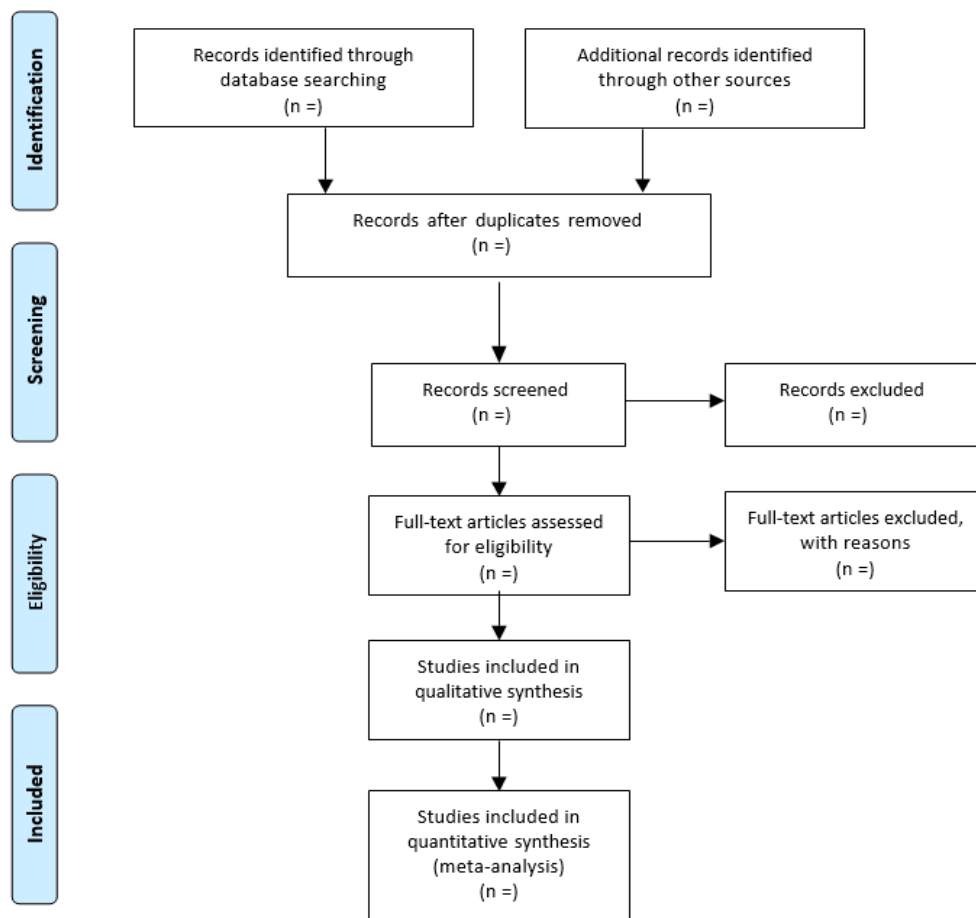
2.1.5. Καταγραφή των δεδομένων

Εφόσον έχουμε καθορίσει και αξιολογήσει τις μελέτες που πρόκειται να κρατήσουμε στην ανάλυση μας, επόμενο βήμα είναι να καταγράψουμε τα δεδομένα που μας παρέχουν αυτές οι μελέτες. Για δικιά μας ευκολία είναι προτιμητέο να δημιουργήσουμε έναν πίνακα (υπολογιστικό φύλλο excel) όπου θα οργανώσουμε όλες τις πληροφορίες από κάθε μελέτη. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν τον αναγνωριστικό κωδικό στην βάση δεδομένων PUBMED για την κάθε μελέτη, τον συγγραφέα και το έτος δημοσίευσης. Έπειτα, γίνεται καταγραφή ορισμένων χαρακτηριστικών που αφορούν τον σχεδιασμό και την εκτέλεση του πειράματος που εκτελεί η εκάστοτε μελέτη όπως: την μέθοδο μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, το όνομα της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται καθώς και τον αντίστοιχο τύπο καρκίνου που εκπροσωπεί. Επιπλέον, καταγράφεται η χημικής ένωση του λυκίσκου που δοκιμάζεται κάθε φορά και η προέλευση αυτής, η οποία μπορεί να είναι είτε αγορασμένη από κάποια εταιρεία, είτε να έχει γίνει σύνθεση από μια άλλη χημική ένωση, η οποία έχει απομονωθεί από τον λυκίσκο, είτε να έχει απομονωθεί από τους ίδιους τους ερευνητές. Στην τελευταία περίπτωση επιπλέον μια καταγραφή του ιστού του λυκίσκου από τον οποίο έχει απομονωθεί η χημική ένωση. Ακόμη, σημειώνεται ο

χρόνος επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση, ο αριθμός των επαναλήψεων του κάθε πειράματος και η συγκέντρωση IC50 μαζί με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση. Τέλος, η εξαγωγή των δεδομένων από τουλάχιστον δύο ερευνητές είναι απαραίτητη για την αποφυγή εισαγωγής εσφαλμένων δεδομένων και επομένως για την μεγιστοποίηση της αξιοπιστίας και της εγκυρότητας [60,61].

2.1.6. Παρουσίαση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της βιβλιογραφικής ανασκόπησης απεικονίζεται σε ένα διάγραμμα ροής PRISMA-2009 flowdiagram. Το συγκεκριμένο διάγραμμα περιλαμβάνει τον αριθμό των μελετών που έχουμε σε κάθε βήμα της συστηματικής ανασκόπησης. Στην κορυφή του διαγράμματος έχουμε το πλήθος των άρθρων που ανακτήθηκαν κατά την αναζήτηση μας από τις διάφορες βάσεις δεδομένων που επιλέξαμε. Στην συνέχεια, φαίνεται ο αριθμός των μελετών των μη διπλότυπων άρθρων καθώς και αυτών που απορρίφθηκαν εφόσον ήταν εκτός θέματος μετά από μια ανάγνωση του τίτλου και της περίληψης. Έπειτα, παρουσιάζεται ο αριθμός των άρθρων που απορρίφθηκαν ύστερα από μια ολοκληρωτική και εξαντλητική ανάγνωση της εκάστοτε δημοσίευσης. Τέλος, παρατηρείται ο συνολικός αριθμός των μελετών που πρόκειται να συμπεριληφθούν στην συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση. Η παρουσίαση της ροής εργασίας για την τελική επιλογή των μελετών φαίνεται στην εικόνα 17 [64].



Εικόνα 17- Απεικόνιση των βημάτων της συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας στο διάγραμμα ροής PRISMA 2009 flow diagram.

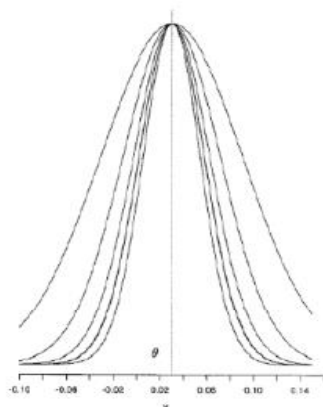
2.3. Μεγέθη επίδρασης και στατιστικά μοντέλα

Το μέγεθος επίδρασης (effect size) χρησιμοποιείται στην στατιστική προκειμένου να περιγράψει την δύναμη της σχέσης μεταξύ μιας εξαρτημένης και μιας ανεξάρτητης μεταβλητής. Συμβολίζεται συνήθως με το ελληνικό γράμμα θ και το τι ακριβώς αντιπροσωπεύει εξαρτάται από το είδος των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, σε δυαδικά δεδομένα, το μέγεθος επίδρασης μπορεί να είναι ο σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (Odds ratio), η διαφορά του κινδύνου ενός αποτελέσματος μεταξύ δύο καταστάσεων [γνωστό και ως σχετικός κίνδυνος (risk difference)], ο λόγος της πιθανότητας μιας δράσης ανάμεσα σε δύο καταστάσεις

[σχετικός κίνδυνος (risk ratio)]. Από την άλλη, στα συνεχή δεδομένα το μέγεθος επίδρασης μπορεί να αφορά την διαφορά των μέσων τιμών που είναι τυποποιημένη (standardized mean difference) ή μη τυποποιημένη (unstandardized mean difference). Επιπλέον, όσον αφορά την μελέτη της διαγνωστικής ακρίβειας το μέγεθος επίδρασης είναι η ευαισθησία και η ειδικότητα. Εφόσον έχει υπολογιστεί το μέγεθος επίδρασης της κάθε μελέτης ξεχωριστά, πραγματοποιείται υπολογισμός του συγκεντρωτικού μεγέθους αποτελέσματος το οποίο αποτελεί έναν σταθμισμένο μέσο όρο των επιμέρους μεγεθών επίδρασης [65].

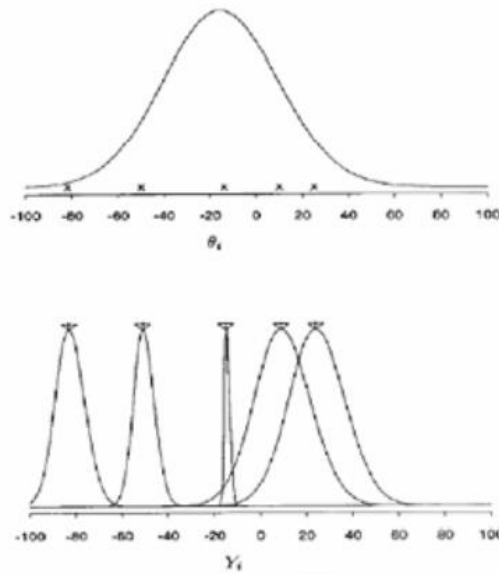
Όλες οι παραπάνω κατηγορίες έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν διάφορα μοντέλα τα οποία καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο συνεισφέρει η κάθε μελέτη στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα. Τα μοντέλα αυτά είναι το *μοντέλο σταθερών επιδράσεων* (*fixed effect model*) και το *μοντέλο τυχαίων επιδράσεων* (*random effect model*). Η διάκριση μεταξύ αυτών των μοντέλων έχει να κάνει με την ύπαρξη ή όχι της ετερογένειας. Η ετερογένεια είναι η πραγματική διαφορά στα μεγέθη επιδράσεων που σχετίζονται με εγγενείς παράγοντες των μελετών που περιλαμβάνονται στην μετα-ανάλυση. Οι διαφορές, για παράδειγμα, στα χαρακτηριστικά των κοορτών και στις επιλογές θεραπείας, μαζί με άλλους παράγοντες, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι μελέτες δεν θα έχουν ένα κοινό μέγεθος επίδρασης, αλλά θα έχουν ετερογενείς επιδράσεις.

Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι όλες οι μελέτες που εξετάζονται στην μετα-ανάλυση έχουν το ίδιο κοινό πραγματικό μέγεθος επίδρασης. Οι διαφορές μεταξύ των παρατηρούμενων επιδράσεων σχετίζονται με το σφάλμα της δειγματοληψίας και οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της επίδρασης θεωρείται ότι είναι οι ίδιοι σε όλες τις μελέτες. Συνεπώς, στην προκειμένη περίπτωση δεν υπάρχει ετερογένεια και το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα είναι η εκτίμηση μιας κοινής πραγματικής επίδρασης ενώ τα διαστήματα εμπιστοσύνης απεικονίζουν την αβεβαιότητα γύρω από αυτήν την εκτίμηση [66]. Στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων, το μέγεθος επίδρασης ακολουθεί μια κανονική κατανομή, δηλαδή τα δείγματα των μελετών προέρχονται από ένα ενιαίο πληθυσμό που έχει ένα κοινό μέγεθος επίδρασης θ , με μια διακύμανση (s_i) και εκφράζεται από τον παρακάτω τύπο: $Y_i \sim N(\theta, s_i^2)$ για $i=1,2,3,\dots,k$ όπου k είναι ο αριθμός των μελετών (εικόνα 18).



Εικόνα 18 - Η κατανομή πέντε υποθετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας το μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Όλα τα δείγματα εκτιμούν ένα πληθυσμό με κοινό μέγεθος επίδρασης θ . Η διαφορά ανάμεσα στις πέντε μελέτες είναι η διαφορετική διακύμανση κάθε μελέτης s_i^2 .

Από την άλλη, το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι υπάρχουν πραγματικές διαφορές ανάμεσα στις μελέτες. Τα μοντέλα τυχαίων επιδράσεων προτιμώνται όταν οι κοόρτες μελέτης αναμένεται να είναι διαφορετικές ή οι επιλογές θεραπείας δεν είναι πανομοιότυπες μεταξύ των μελετών. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρέχουν μια εκτίμηση της μέσης πραγματικής επίδρασης ενώ τα διαστήματα εμπιστοσύνης παρουσιάζουν την αβεβαιότητα γύρω από την εκτίμηση αυτήν, συμπεριλαμβανομένης της παραμέτρου της ετερογένειας. Η μεγαλύτερη ετερογένεια συνεπάγεται με πιο συντηρητικά αποτελέσματα, δηλαδή μεγαλύτερο εύρος των διαστημάτων εμπιστοσύνης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μοντέλα τυχαίας επίδρασης εισάγουν το στοιχείο της διακύμανσης στο βάρος της κάθε μελέτης, ώστε να ληφθεί υπόψιν η μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών. Συνοπτικά, κάθε μελέτη έχει το δικό της μέγεθος επίδρασης θ_i και μια συγκεκριμένη διακύμανση διασπορά s_i , εικόνα 19, ενώ ακολουθεί τον συγκεκριμένο τύπο $\theta_i|\theta, \tau^2 \sim N(\theta, \tau^2)$ [65,66].



Εικόνα 19- Η κατανομή πέντε υποθετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Κάθε δείγμα εκτιμά έναν πληθυσμό με διαφορετικό μέγεθος επίδρασης θ_i με διακύμανση s_i^2 . Η απόσταση της καμπύλης (συνολικά) αντιπροσωπεύει τη μεταξύ των μελετών μεταβλητότητα τ^2 .

Συγκεντρωτικά, στον παρακάτω πίνακα έχουμε την δυνατότητα να παρατηρήσουμε τον τρόπο με τον οποίο γίνεται ο στατιστικός υπολογισμός της μετα-ανάλυσης, για τα δύο προαναφερθέντα μοντέλα, για την εξαγωγή του συγκεντρωτικού αποτελέσματος, καθώς και επίσης ο τρόπος υπολογισμού των βαρών για την εκάστοτε μελέτη [65].

Πίνακας 2. Τρόπος υπολογισμού του συγκεντρωτικού αποτελέσματος και του βάρους της κάθε μελέτης για τα μοντέλα των σταθερών και των τυχαίων επιδράσεων, αντιστοίχως. Όπου y_i είναι το μέγεθος της επίδρασης, s_i είναι η διακύμανση (standard error), w_i για την εκάστοτε μελέτη και τ^2 η μεταξύ των μελετών μεταβλητότητα.

	Μοντέλο σταθερών επιδράσεων	Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων
Συγκεντρωτικό αποτέλεσμα	$\hat{\theta} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i y_i}{\sum_{i=1}^k w_i}$	$\widehat{\theta_{(\tau)}} = \frac{\sum_{i=1}^k w_{i(\tau)} y_i}{\sum_{i=1}^k w_{i(\tau)}}$
Βάρος εκάστοτε μελέτης	$w_i = \frac{1}{s_i^2}$	$w_{i(\tau)} = \frac{1}{s_i^2 + \tau^2}$

2.4. Έλεγχος ετερογένειας

Όπως είδαμε, η ετερογένεια είναι η πραγματική διαφορά στα μεγέθη επιδράσεων και μπορεί να σχετίζεται με ποικίλους παράγοντες στον σχεδιασμό της εκάστοτε μελέτης. Η παρουσία ή όχι της ετερογένειας είναι ένα κρίσιμο δεδομένο, καθώς αυτό μπορεί να μας οδηγήσει σε διαφορετικές στατιστικές μεθόδους για την περίληψη των δεδομένων αλλά και σε μια διαφορετική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εάν δηλαδή, θεωρούμε ότι όλες οι μελέτες μοιράζονται ένα κοινό μέγεθος επίδρασης τότε γίνεται χρήση ενός μοντέλου σταθερών επιδράσεων. Όμως, σε περίπτωση που αποδεχτούμε την ύπαρξη της ετερογένειας, τότε θα χρησιμοποιηθεί ένα μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Θα μελετήσουμε επομένως τους στατιστικούς ελέγχους με τους οποίους γίνεται ο έλεγχος της ποσοτικής ύπαρξης της ετερογένειας [65,66].

1. Στατιστική συνάρτηση Q

Η στατιστική συνάρτηση Q, γνωστή και ως Cochrane's Q, είναι ένα μέτρο της συνολικής παρατηρούμενης διασποράς των εκτιμώμενων μεγεθών επιδράσεων. Πρόκειται για ένα σταθμισμένο άθροισμα τετραγώνων και ο υπολογισμός του γίνεται με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο :

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i (Y_i - M)^2$$

Αναλύοντας τον συγκεκριμένο τύπο, το w_i αφορά το βάρος της εκάστοτε μελέτης, όπου Y_i έχουμε το μέγεθος επίδρασης της κάθε μελέτης και M είναι το συνολικό μέγεθος επίδρασης όλων των μελετών. Οι συνήθεις τιμές p-value της ετερογένειας για τις οποίες το αποτέλεσμα θεωρείται στατιστικά σημαντικό είναι για τιμές μικρότερες του 0.10 ή του 0.05.

2. Τεστ τ^2 (tau-squared)

Το συγκεκριμένο στατιστικό μέτρο το οποίο περιγράφει την διακύμανση του μεγέθους επίδρασης στον πληθυσμό των μελετών. Η πιο κοινή μέθοδος για την εκτίμηση της διακύμανσης μεταξύ των μελετών είναι αυτή των DerSimonian και Laird, η οποία βασίζεται στην μέθοδο των ροπών. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο εξής:

$$\tau^2 = \frac{Q - df}{C}$$

Όπου

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i (Y_i - M)^2$$

$$C = \sum_{i=1}^k w_i - \frac{\sum_{i=1}^k w_i^2}{\sum_{i=1}^k w_i}$$

Επιπλέον, όπου df (Degrees of freedom) = $k - 1$. Το k αντιπροσωπεύει τον αριθμό των μελετών που εισήχθησαν στην ανάλυση.

3. Τεστ I^2

Το I^2 είναι ένα περιγραφικό στατιστικό μέτρο εκφράζει το ποσοστό της συνολικής παρατηρούμενης διασποράς που οφείλεται στον πληθυσμό και όχι στο τυχαίο σφάλμα. Υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$I^2 = \frac{Q - df}{Q}$$

Υποστηρίζεται ότι τα ποσοστά 25%, 50% και 75% αντιστοιχούν σε χαμηλή, ενδιάμεση και υψηλή ετερογένεια, αντιστοίχως.

Συγκεντρωτικά, το στατιστικό μέτρο Q ελέγχει εάν τα μεγέθη επίδρασης είναι ομοιογενή, το τ^2 ποσοτικοποιεί την ετερογένεια και το μέτρο I^2 εκφράζει την αναλογία της διασποράς λόγω ετερογένειας.

2.5. Διάστημα εμπιστοσύνης

Το διάστημα εμπιστοσύνης [Confidence Interval (CI)] είναι ένα περιγραφικό στατιστικό μέτρο το οποίο περιλαμβάνει ένα εύρος τιμών που έχει υπολογιστεί από ένα δείγμα παρατηρήσεων και μας δίνει μια γνώση του μεγέθους πληθυσμού (ή των "σωστών τιμών"). Ενώ το διάστημα εμπιστοσύνης παρέχει μια εκτίμηση ενός άγνωστου συντελεστή πληθυσμού, το χρονικό διάστημα που υπολογίζεται από ένα δεδομένο δείγμα δεν περιέχει απαραίτητα την πραγματική τιμή του συντελεστή. Έτσι, δημιουργούνται διαστήματα εμπιστοσύνης με το επίπεδο εμπιστοσύνης που επιλέγει ο χρήστης. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο διάστημα εμπιστοσύνης είναι το 95% και έπειτα το 90% και το 99%. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η διαδικασία εκτίμησης πρέπει να επαναλαμβάνεται ξανά και ξανά με δείγματα από τον ίδιο πληθυσμό και ότι 95 (90 ή 99 αντίστοιχα του επιπέδου εμπιστοσύνης) περίοδοι των υπολογισμένων περιόδων έχουν πραγματική αξία.

Οι τύποι για τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης έχουν τη γενική μορφή:

$$CI = \text{Εκτίμηση σημείου} \pm \text{Περιθώριο σφάλματος}$$

$$\text{Εκτίμηση σημείου} \pm \text{Κρίσιμη τιμή (z)} \times \text{Τυπικό σφάλμα σημείου εκτίμησης}$$

Η εκτίμηση σημείου αναφέρεται στη στατιστική που υπολογίζεται από δείγματα δεδομένων. Η κρίσιμη τιμή ή η τιμή z εξαρτάται από το επίπεδο

εμπιστοσύνης και προέρχεται από τα μαθηματικά της τυπικής κανονικής καμπύλης. Για τα επίπεδο εμπιστοσύνης 90%, 95% και 99% η τιμή z είναι 1.65, 1.96, 2.58, αντιστοίχως.

Τα δύο άκρα του διαστήματος εμπιστοσύνης καλούνται όριο ή σύνορο. Το διάστημα εμπιστοσύνης δύναται να είναι μονόπλευρο ή διπλής όψης. Ένα διάστημα εμπιστοσύνης δύο όψεων περικλείει την παράμετρο πληθυσμού τόσο από κάτω (κάτω όριο) όσο και από πάνω (άνω όριο). Αντίθετα, ένα μονόπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης παρέχει ένα όριο για την παράμετρο πληθυσμού είτε από πάνω είτε από κάτω.

Οι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν το διάστημα εμπιστοσύνης είναι το επίπεδο εμπιστοσύνης, το μέγεθος του δείγματος και η διασπορά του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, ένα μεγαλύτερο δείγμα θα απαιτούσε ένα στενότερο διάστημα εμπιστοσύνης. Ομοίως, μεγαλύτερη διασπορά μέσα στο δείγμα ή μεγαλύτερο επίπεδο εμπιστοσύνης θα παράγουν ένα πιο ευρύ διάστημα εμπιστοσύνης [67].

2.6. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης

Η μετα-ανάλυση παλινδρόμησης ή αλλιώς μετα-παλινδρόμηση (meta-regression), αποτελεί μια επέκταση της μετα-ανάλυσης και διερευνά τον βαθμό στον οποίο η στατιστική ετερογένεια μεταξύ των αποτελεσμάτων από πολλαπλές μελέτες μπορεί να σχετίζεται με ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά των μελετών, κάνοντας χρήση των αρχών της παλινδρόμησης. Όπως και στην μετα-ανάλυση έτσι και εδώ εντοπίζουμε δύο διαφορετικά μοντέλα [68]:

- **Μετα-παλινδρόμηση σταθερών επιδράσεων**

Πρόκειται για μια επέκταση της μετα-ανάλυσης σταθερών επιδράσεων με την διαφορά ότι το μέγεθος επίδρασης θ αντικαθίσταται από έναν γραμμικό παράγοντα

πρόβλεψης $x_i\beta$. Υποθέτουμε ότι η μελέτη i , από τις συνολικές k μελέτες, μας παρέχει μια εκτίμηση y_i του μεγέθους επίδρασης, μαζί με ένα τυπικό σφάλμα, σ_i . Πιο συγκεκριμένα ο τύπος που εκφράζει το συγκεκριμένο μοντέλο είναι :

$$y_i \sim N(\theta_i, \sigma_i^2) \quad \text{όπου} \quad \theta_i = x_i\beta$$

Ισοδύναμα:

$$y_i = x_i\beta + \varepsilon_i \quad \text{όπου} \quad \varepsilon_i \sim N(0, \sigma_i^2)$$

Όπου το β είναι ένα διάνυσμα $k \times 1$ διαστάσεων που περιέχει τους συντελεστές (coefficients) και το x_i ένα διάνυσμα $1 \times k$ διαστάσεων που περιέχει τις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών της μελέτης i .

- **Μετα-παλινδρόμηση τυχαίων επιδράσεων**

Στην περίπτωση που οι ανεξάρτητες μεταβλητές δεν μπορούν να περιγράψουν την διακύμανση μεταξύ των μελετών, τότε γίνεται εισαγωγή μιας υπολειπόμενης ετερογένειας υποθέτοντας ότι τα πραγματικά μεγέθη επίδρασης ακολουθούν μια κανονική κατανομή γύρω από αυτόν τον γραμμικό παράγοντα πρόβλεψης :

$$y_i | \theta_i \sim N(\theta_i, \sigma_i^2), \quad \text{όπου} \quad \theta_i \sim N(x_i\beta, \tau^2)$$

Επομένως:

$$y_i \sim N(x_i\beta, \sigma_i^2 + \tau^2)$$

Ισοδύναμα:

$$y_i = x_i\beta + u_i + \varepsilon_i, \quad \text{όπου} \quad u_i \sim N(0, \tau^2) \text{ και } \varepsilon_i \sim N(0, \sigma_i^2)$$

Όλοι οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση της μετα-παλινδρόμησης τυχαίων επιδράσεων, εκτιμούν πρώτα την μεταξύ των μελετών διακύμανση τ^2 και ύστερα υπολογίζουν τους συντελεστές β , κάνοντας χρήση του αλγορίθμου των σταθμισμένων ελαχίστων τετραγώνων [Weighted Least Squares(WLS)], έχοντας ως βάρη το $\frac{1}{\sigma_i^2 + \tau^2}$.

2.7. Τυποποιημένη διαφορά μέσων (Standardized Mean Difference)

Η τυποποιημένη διαφορά μέσων [Standardized Mean Difference (SMD)], γνωστή και ως Cohen's d, χρησιμοποιείται στην στατιστική και ιδιαίτερα στην μετα-ανάλυση όταν οι μελέτες αξιολογούν το ίδιο αποτέλεσμα, αλλά η εκτίμηση του προέρχεται με διαφορετικό τρόπο. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της εύρεσης της διαφοράς ενός μεγέθους επίδρασης μεταξύ μιας πειραματικής ομάδας και μιας ομάδας ελέγχου. Η τυποποιημένη διαφορά μέσων ε βάση τις πραγματικές τιμές των μελετών ορίζεται ως η διαφορά της τυποποιημένης δειγματικής μέσης τιμής της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου. Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο εξής:

$$SMD = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{pooled}}, \text{ όπου } S_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Τα n_1 και n_2 αντιπροσωπεύουν το πλήθος των συμμετεχόντων σε κάθε ομάδα αντιστοίχως. Η εκτίμηση της διακύμανσης της τυποποιημένης διαφοράς υπολογίζεται από την σχέση $\widehat{Var}(SMD) = \frac{n_1+n_2}{n_1n_2} + \frac{SMD^2}{2(n_1+n_2-2)}$. Επιπλέον, προκύπτει το $100(1 - \alpha)\%$ διάστημα εμπιστοσύνης για την τυποποιημένη διαφορά μέσων:

$$[L_{SMD}, U_{SMD}] = \left[SMD - z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\widehat{Var}(SMD)}, SMD + z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\widehat{Var}(SMD)} \right]$$

Το $z_{1-\alpha/2}$ αντιπροσωπεύει το $1 - \alpha/2$ ποσοστιαίο σημείο της τυπικής κανονικής κατανομής [69].

2.8. Διαδικασία καταλογισμού στα ελλείποντα δεδομένα

Στις στατιστικές αναλύσεις, η απουσία ορισμένων δεδομένων είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο και η απόφαση για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος δύναται να αλλάξει εντελώς το τελικό αποτέλεσμα. Η απουσία των δεδομένων δημιουργεί ορισμένες δυσκολίες στην διαχείριση και την ανάλυση των δεδομένων, εισάγει μια ποσότητα μεροληψίας στα αποτελέσματα, ενώ παράλληλα μειώνει την αξιοπιστία τους. Για τους λόγους αυτούς είναι πολύ σημαντικό ο ερευνητής να διαχειριστεί την απουσία των δεδομένων. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να αντιμετωπισθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα.

Η πιο απλή μέθοδος που χρησιμοποιείται (complete case analysis), αφορά την παράλειψη των μελετών στις οποίες υπάρχουν ανεπαρκή δεδομένα. Με άλλα λόγια, στην ανάλυση εισάγονται μόνο έρευνες που δεν παραλείπεται κανένα δεδομένο. Παρόλο που η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει απώλειες όσον αφορά την στατιστική της ισχύ, καθώς χάνεται ορισμένη πληροφορία, το αποτέλεσμα της είναι πλήρως αμερόληπτο [70].

Ακόμα μια δημοφιλής τεχνική, είναι ο μέσος καταλογισμός (mean imputation). Στην περίπτωση αυτήν γίνεται αντικατάσταση των ελλειπόντων δεδομένων με τον μέσο όρο των παρατηρηθέντων δεδομένων. Συνεπώς, αντιμετωπίζει τα δεδομένα τα οποία απουσιάζουν σαν να έχουν παρατηρηθεί, κάτι το οποίο εισάγει έναν βαθμό αβεβαιότητας γύρω από τις τιμές που καταλογίστηκαν.

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε η απουσία ορισμένων δεδομένων όσον αφορά την τυπική απόκλιση των δεικτών IC50. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ενιαίου καταλογισμού των δεδομένων (single imputation), δηλαδή η συμπλήρωση των ελλειπόντων δεδομένων πραγματοποιείται με βάση άλλες γνωστές τιμές οι οποίες έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά με τα

εν λόγω δεδομένα [71]. Πιο συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά που συγκρίνονται αφορούν τον σχεδιασμό του πειράματος, όπως την μέθοδο μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας που χρησιμοποιήθηκε, την χημική ένωση και την κυτταρική σειρά. Επομένως, αναζητούμε άλλες μελέτες που μας παρέχουν το συγκεκριμένο μέτρο με όσο τον δυνατόν πιο κοινά χαρακτηριστικά με την έρευνα στην οποία απουσιάζει η αντίστοιχη τυπική απόκλιση του δείκτη IC50. Ως πρωτεύον χαρακτηριστικό το οποίο συγκρίνουμε, είναι η μέθοδος μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας και ύστερα να χρησιμοποιούν κοινή χημική ένωση και τύπο κυττάρων. Επομένως, σε περίπτωση που εντοπισθεί μια μελέτη η οποία χρησιμοποιεί μια μοναδική μέθοδο μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, τότε αυτή αποκλείεται από την ανάλυση.

2.9. Στατιστικό πακέτο STATA

Το STATA είναι ένα στατιστικό πακέτο λογισμικού γενικής χρήσης που δημιουργήθηκε για την στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση των δεδομένων. Αναπτύχθηκε από την Computing Resource Centre στην Καλιφόρνια και η πρώτη του έκδοση κυκλοφόρησε το 1985. Η συγκεκριμένη εταιρεία μεταφέρθηκε το 1993 στο College Station του Τέξας, όπου μετονομάστηκε σε Stata Corporation ή όπως είναι σήμερα γνωστή ως StataCorp. Η πρώτη έκδοση του STATA (Stata 1.0) ήταν ένα μικρό πρόγραμμα το οποίο δεν κάλυπτε όλες τις καθιερωμένες στατιστικές αναλύσεις καθώς ισχυρίζεται ότι ήταν ένα πακέτο παλινδρόμησης με χαρακτηριστικά διαχείρισης δεδομένων όπου στο σύνολο του είχε 44 εντολές. Πρόκειται για ένα εργαλείο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από επιστήμονες σε πολλούς και διαφορετικούς κλάδους όπως αυτοί της επιδημιολογίας, των οικονομικών, της ψυχολογίας, της κοινωνιολογίας και της ιατρικής [72]. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε το STATA για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων καθώς μέσα από τις έτοιμες εντολές που διαθέτει δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία από τον χρήστη. Τέλος, μέσα από την διαδραστική γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ο χρήστης είναι σε θέση να τα ερμηνεύσει και να τα κατανοήσει σε μεγαλύτερο βαθμό.

2.9.1 Εντολές που χρησιμοποιήθηκαν μέσω STATA

Στην συγκεκριμένη υποενότητα θα γίνει μια επεξήγηση και ανάλυση των εντολών που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση της συγκεκριμένης έρευνας κάνοντας χρήση, όπως προαναφέραμε, του στατιστικού πακέτου STATA. Εντολές με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, όπως η *metan* και η *metareg*, θα αναλυθούν περαιτέρω σε επόμενη ενότητα. Στον παρακάτω πίνακα παρατηρούμε τις εντολές που χρησιμοποιήθηκαν [73].

Πίνακας 3. Επεξήγηση των βασικών εντολών-συναρτήσεων που χρησιμοποιήθηκαν μέσω του στατιστικού πακέτου STATA.

Generate	Δημιουργία μια νέας μεταβλητής
sqrt(number)	Υπολογισμός της τετραγωνικής ρίζας της μεταβλητής number
Metan	Μας παρέχει μεθόδους για την πραγματοποίηση της μετα-ανάλυσης
Metareg	Εκτελεί μετα-παλινδρόμηση μέσω ενός μοντέλου τυχαίων επιδράσεων

Επιπλέον, στον επόμενο πίνακα παρατηρούμε ορισμένους από τους ειδικούς χαρακτήρες και σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να γίνει κάποιος λογικός έλεγχος ή κάποια μαθηματική πράξη [73].

Πίνακας 4. Επεξήγηση των ειδικών χαρακτήρων και συμβόλων που χρησιμοποιήθηκαν.	
==	Σχεσιακός τελεστής ισότητας
!=	Σχεσιακός τελεστής ανισότητας
	Λογικός τελεστής Ή
&	Λογικός τελεστής ΚΑΙ
+	Μαθηματικό σύμβολο πρόσθεσης
-	Μαθηματικό σύμβολο αφαίρεσης
/	Μαθηματικό σύμβολο διαίρεσης

2.9.1.1. Εντολή *metan*

Όταν πολλές μελέτες έχουν παρόμοιο σχεδιασμό, είναι συχνά λογικό και επακόλουθο να προσπαθούμε να συνδυάσουμε τις πληροφορίες από όλες αυτές τις μελέτες προκειμένου να διερευνήσουμε συνάφειες και αποκλίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων τους και γενικότερα να αποκτήσουμε μεγαλύτερη ακρίβεια στα συμπεράσματά μας. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζουμε μετα-ανάλυση μέσω του στατιστικού πακέτου STATA. Μια από τις πολλές εντολές που μας παρέχεται για μετα-ανάλυση, είναι η εντολή **metan**. Η σύνταξη της συγκεκριμένης εντολής ακολουθεί την παρακάτω μορφή :

metan varlist [if] [in] [, options]

Όπου το varlist μπορεί να περιέχει δύο, τρεις, τέσσερις ή έξι αριθμητικές μεταβλητές με βάση την δομή των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, προκύπτουν διαφορετικές μορφές σύνταξης, όμως θα γίνει περιγραφή μόνο της δομής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Σε περίπτωση που θέλουμε να εκτελέσουμε μετα-ανάλυση σε δεδομένα στα οποία έχει ήδη γίνει ο υπολογισμός του μεγέθους

επίδρασης (effect size) και των τυπικών σφαλμάτων για την αντίστοιχη τιμή, τότε η εντολή θα έχει την συγκεκριμένη μορφή :

metan ES seES [if] [in] [, npts(varname) model_spec options_main]

Αναλύοντας την συγκεκριμένη σύνταξη έχουμε: στην θέση του *ES* εισάγουμε το μέγεθος επίδρασης, στο *seES* το τυπικό σφάλμα και επίσης στην θέση *npts(varname)* έχουμε την δυνατότητα να εισάγουμε τον αριθμό των συμμετεχόντων. Στα πεδία *[if]* και *[in]* μπορούμε εμείς οι ίδιοι να καθορίσουμε τις προϋποθέσεις για το ποιες μελέτες θα εισαχθούν στην μετα-ανάλυση. Το *model_spec* καθορίζει τις μεθόδους και τα μοντέλα που θα χρησιμοποιηθούν για την μετα-ανάλυση, συμπεριλαμβανομένου της εκτίμησης των στατιστικών ετερογένειας. Το προκαθορισμένο μοντέλο που χρησιμοποιείται, σε περίπτωση δηλαδή που ο χρήστης δεν εισάγει κάτι στο συγκεκριμένο πεδίο, είναι το μοντέλο των σταθερών επιδράσεων. Η πιο απλή εναλλακτική είναι η εισαγωγή της παραμέτρου *random*, σύμφωνα με την οποία εφαρμόζεται το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων, DerSimonian-Laird. Τέλος, η επιλογή *options_main* αφορά ορισμένες πιο γενικές λειτουργίες κάποιες από τις οποίες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [65].

Πίνακας 5. Πληροφορίες σχετικά με ορισμένες από τις πιο κύριες λειτουργίες της παραμέτρου *options_main* της εντολής *metan*.

label([namevar=namevar] [, yearvar=yearvar])	Τρόπος ονοματοδοσίας των μελετών για τον πίνακα των αποτελεσμάτων και το διάγραμμα δάσους. Εισάγουμε τα ονόματα των συγγραφέων και τις χρονολογίες δημοσίευσης των μελετών
by(subgroup_id [, missing])	Εφαρμογή μετα-ανάλυσης σε μια συγκεκριμένη υποομάδα με όνομα <i>subgroup_id</i> , προκειμένου να μελετηθούν οι διαφορές και οι ομοιότητες μεταξύ των ομάδων αυτών. Γίνεται υπολογισμός του μεγέθους επίδρασης για κάθε κατηγορία ξεχωριστά, αλλά και για το σύνολο όλων των μελετών
Eform	Εκθέτει τα μεγέθη επίδρασης και το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης

level(#), ilevel(#), olevel(#)	Θέτουμε το επίπεδο εμπιστοσύνης που επιθυμούμε για τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης, είτε για τις μεμονωμένες μελέτες είτε για τις συνολικές. Το προκαθορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης είναι 95%
sortby(varname)	Ταξινόμηση των αποτελεσμάτων, με βάση το <i>varname</i> , στον πίνακα των αποτελεσμάτων αλλά και στο διάγραμμα δάσους
wgt(varname)	Εισαγωγή μιας μεταβλητής <i>varname</i> η οποία θα περιέχει τα βάρη της κάθε μελέτης. Με τον τρόπο αυτό ο χρήστης έχει την δυνατότητα να καθορίζει μόνος του τα βάρη
forestplot(forestplot_options)	Επιπλέον επιλογές που αφορούν την επεξεργασία και την αποθήκευση των διαγραμμάτων δάσους

2.9.1.2. Εντολή *metareg*

Η συγκεκριμένη εντολή χρησιμοποιείται για την εφαρμογή μιας μετα-παλινδρόμησης τυχαίων επιδράσεων. Η σύνταξη της εντολής *metareg* είναι η παρακάτω [68]:

```
metareg depvar [indepvars] [if] [in] wsse(varname) [, eform graph randomsize  
noconstant mm reml eb knapphartung z tau2test level(#) permute(# [, univariable  
detail joint (varlist1 [, varlist2 ...])]) log maximize_options]
```

Όπως αναφέραμε, η ανάλυση μετα-παλινδρόμησης εξετάζει τον τρόπο με τον οποίο αλληλοεπιδράει η εξαρτώμενη μεταβλητή (μέγεθος επίδρασης που μελετάμε)

με μια ή περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές με σκοπό να διερευνηθούν τα αίτια της ετερογένειας. Επομένως, στο πεδίο *depvar* εισάγουμε την εξαρτώμενη μεταβλητή και στο *[indepvars]* την μια ή τις περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές. Ακόμη, μέσω των λογικών ελέγχων *[if]* και *[in]* μπορούμε να επιλέξουμε ορισμένες μόνο υποομάδες των ανεξάρτητων μεταβλητών. Στον παρακάτω πίνακα θα επικεντρωθούμε στις κύριες λειτουργίες των υπόλοιπων παραμέτρων:

Πίνακας 6. Πληροφορίες σχετικά με τις παραμέτρους της εντολής *metareg*.

<i>wsse(varname)</i>	Προσδιορίζει την μεταβλητή που περιέχει το τυπικό σφάλμα της εξαρτώμενης μεταβλητής (<i>depvar</i>), για κάθε μια μελέτη. Η παράμετρος αυτή είναι υποχρεωτική και όλες οι τιμές πρέπει να είναι μεγαλύτερες του μηδενός
<i>Eform</i>	Υποδεικνύει την παραγωγή των συντελεστών σε εκθετική μορφή
<i>Graph</i>	Δημιουργείται στην έξοδο μια γραφική παράσταση ευθείας προσαρμοσμένη στις εκτιμήσεις της εκάστοτε μελέτης, που αντιπροσωπεύονται από τους χαρακτηριστικούς κύκλους, εν συναρτήσει των τιμών της πρώτης ανεξάρτητης μεταβλητής, στο <i>[indepvar]</i> . Ως προεπιλογή, το μέγεθος του εκάστοτε κύκλου αντιστοιχεί στο βάρος που έχει δοθεί στην κάθε μελέτη μέσω του μοντέλου σταθερών επιδράσεων
<i>Randomsize</i>	Για την χρήση αυτής της παραμέτρου θα πρέπει να έχει προηγηθεί πρώτα η <i>graph</i> . Καθορίζει ότι το μέγεθος των κύκλων εξαρτάται από τα βάρη του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων
<i>Mm</i>	Καθορίζει την χρήση της μεθόδους των ροπών (method of moments) για τον υπολογισμό της διακύμανσης μεταξύ των μελετών τ^2
<i>Reml</i>	Καθορίζει την χρήση της μεθόδους της υπολειπόμενης μέγιστης πιθανότητας (residual maximum likelihood) για τον υπολογισμό της διακύμανσης μεταξύ των μελετών τ^2
<i>Eb</i>	Καθορίζει την χρήση των εμπειρικών μεθόδων Bayes (empirical Bayes) για τον υπολογισμό του

$$\tau^2$$

Level(#)	Καθορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης, σαν ποσοστό, για τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης. Ως προεπιλογή χρησιμοποιείται το 95%
permute(...)	Υπολογίζει τα p-values κάνοντας χρήση ενός τεστ μετάθεσης Monte carlo. Επιπλέον εκτελεί και πολλαπλά τεστ για τον υπολογισμό των p-values από την πιο σημαντική έως την πιο ασήμαντη ανεξάρτητη μεταβλητή

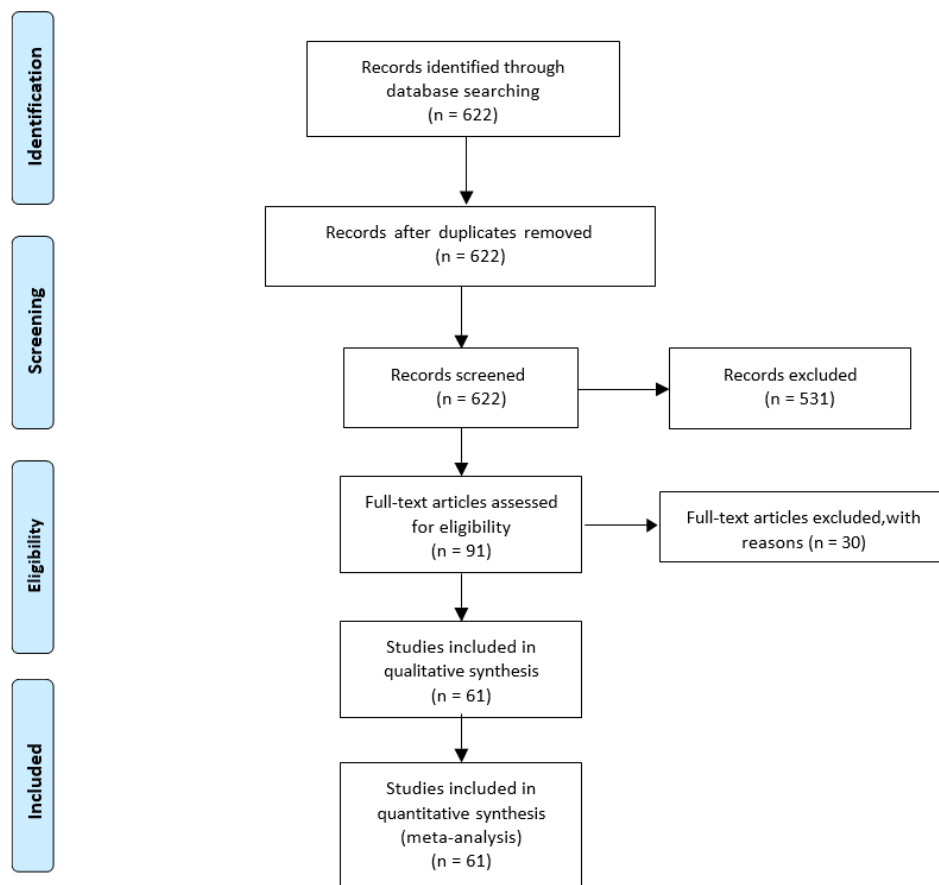
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα

3.1. Βάση δεδομένων και λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν

Για την συλλογή των δεδομένων και την περάτωση της συγκεκριμένης μετα-ανάλυσης η βάση δεδομένων η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι η PubMed. Τέθηκαν ορθά διατυπωμένα επιστημονικά ερωτήματα και βρέθηκαν επιστημονικές έρευνες που να συσχετίζονται με την επίδραση των χημικών ενώσεων του λυκίσκου στον καρκίνο. Οι λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιήσαμε ήταν οι ακόλουθες: (hop or hops or "humulus lupulus") and (Όλες οι χημικές ενώσεις του λυκίσκου [10]) and (cancer or *carcinoma or carcinoma or neoplasm or tumor or tumour or proliferation). Η αναζήτηση των σχετικών μελετών έγινε μέχρι και τις 21 Αυγούστου του 2022.

3.2. Επιλογή μελετών και εξαγωγή δεδομένων

Από την συστηματική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε στην βιβλιογραφική βάση δεδομένων PubMed, 622 μελέτες φαίνεται να αντιστοιχούν με τις λέξεις κλειδιά που αναφέραμε παραπάνω. Αυτές οι μελέτες ομαδοποιήθηκαν σε ένα αρχείο Excel με το χαρακτηριστικό κωδικό PMID, τον συγγραφέα, το έτος και μια επιπλέον στήλη που καθορίζει το ποιες μελέτες θα συμπεριληφθούν στην παρούσα μετα-ανάλυση και επεξηγώντας τον λόγο που απορρίφθηκαν οι υπόλοιπες. Για να εισαχθεί μια μελέτη στο τελικό στάδιο το οποίο αφορά την μετα-ανάλυση, σε περίπτωση που δεν μας παρέχει την τιμή της τυπικής απόκλισης του μέτρου IC50, θα πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον μια άλλη μελέτη η οποία χρησιμοποιεί την ίδια μέθοδο μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας και μας παρέχει την αντίστοιχη τιμή της τυπικής απόκλισης. Ο λόγος για τον οποίο γίνεται αυτό αφορά την διαδικασία του καταλογισμού που αναλύθηκε σε αντίστοιχο κεφάλαιο. Μετά την ανάγνωση των περιλήψεων ή όπου κρίνεται απαραίτητο, ολόκληρων των άρθρων και τον έλεγχο των κριτηρίων επιλογής, συναντήσαμε 61 άρθρα με τα οποία θα συνεχίσουμε στην διαδικασία της μετα-ανάλυσης.



Εικόνα 20- Προτιμώμενα σημεία αναφοράς για συστηματική ανασκόπηση και μετα-αναλύσεις (PRISMA) διάγραμμα ροής για την αναζήτηση στη βιβλιογραφία

Σε αυτό το σημείο θα χρειαστεί να τονίσουμε ότι από την διαδικασία της μετα-ανάλυσης απορρίψαμε πειράματα τα οποία έχουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό όσον αφορά τον σχεδιασμό του πειράματος. Τέτοια μπορεί να είναι η μέθοδος μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, οι ώρες επώασης ή η χημική ένωση. Συνεπώς, επιλέγουμε πειράματα για τα οποία οι συνθήκες διεξαγωγής του έχουν βρεθεί σε ένα ακόμα τουλάχιστον πείραμα.

Από τις 61 μελέτες που κρίθηκαν αποδεκτές για να εισαχθούν στην μετα-ανάλυση έχουν προκύψει συνολικά 317 πειράματα σε κυτταρικές σειρές, εκ των οποίων 262 αφορούν καρκινικές κυτταρικές σειρές ενώ 55 μη καρκινικές. Εντοπίστηκαν συνολικά 19 διαφορετικές μορφές καρκίνου με τον πιο συχνά εμφανιζόμενο να είναι ο καρκίνος του μαστού. Η κατανομή των μορφών καρκίνου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7. Συχνότητες εμφάνισης των διαφόρων μορφών καρκίνου που έχουν παρατηρηθεί στις μελέτες της μετα-ανάλυσης.

Type of cancer	Frequency
Breast	62
Colon	40
Prostate	36
Ovarian	19
Liver	19
Melanoma	18
Lung	11
Pancreas	9
Glioblastoma	8
Neck	8
Leukemia	7
Cervix	5
Myeloma	4
Bone	4
Gastric	4
Esophagus	3
Thyroid	3
Uterus	2

Όσον αφορά της χημικές ενώσεις του λυκίσκου εντοπίστηκαν συνολικά 14 διαφορετικές χημικές ενώσεις με την πιο άφθονη να είναι η ξανθοχουμόλη, η οποία καταλαμβάνει ένα ποσοστό περίπου της τάξης του 55%. Δηλαδή, η συγκεκριμένη χημική ένωση εντοπίζεται σε παραπάνω από τα μισά πειράματα. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν 12 πειράματα στα οποία έγινε χρήση εκχυλίσματος λυκίσκου και όχι κάποια χημική ένωση. Η αναλυτική κατανομή των χημικών ενώσεων φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 8. Συχνότητα εμφάνισης των χημικών ενώσεων στα πειράματα που θα εισαχθούν στην μετα-ανάλυση.

Compounds	Frequency
Xanthohumol	172
Isoxanthohumol	46
8-prenylnaringenin	28
α,β -dihydroxanthohumol	13
6-prenylnaringenin	13
Hop/crude extract	12
Naringenin	10
Lupulone	8
Desmethylxanthohumol	6
Tetrahydro Iso-Alpha Acids	2
α -acids	2
Humulone	2
Iso- α -acids	2
Dihydro-iso-alpha acids	1

Επιπλέον, οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης της κυτταρικής βιωσιμότητας που εντοπίστηκαν είναι οι εξής: SRB μέθοδος (139 πειράματα), μέθοδοι που χρησιμοποιούν άλατα τετραζολίου (153 πειράματα) και Crystal Violet μέθοδος (25 πειράματα).

Τέλος, ο χρόνος επώασης των κυττάρων με την εκάστοτε χημική ένωση είναι ένας σημαντικός παράγοντας του οποίου η επιρροή στο τελικό αποτέλεσμα θα μελετηθεί παρακάτω. Από τα 317 συνολικά πειράματα που διεξήχθησαν 56 επώασαν τα κύτταρα τους για 24 ώρες με την υπό δοκιμή χημική ένωση, τα 104 για 48 ώρες, τα 147 για 72 ώρες ενώ μόλις 10 για 96 ώρες.

Πίνακας 9- Χαρακτηριστικά των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση. Αποτυπώνεται το PMID, η χρονολογία έκδοσης της δημοσίευσης, ο συγγραφέας, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, ο δείκτης IC50 με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ο αριθμός των επαναλήψεων του πειράματος, ο τύπος των κυττάρων και του καρκίνου, η χημική ένωση και η προέλευσή της.

PMID	Year	Author	Assay	IC50	SD	Hours	Number of replicates	Cell line	Cell type	Type of cancer	Compounds	Origin of compound	Referen ce
35229981	2022	Hsieh M	MTT	56.00	7.30	24	3	NPC-039	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	[74]
			MTT	45.60	7.30	24	3	NPC-BM	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	34.90	6.00	24	3		Human normal nasopharyngeal	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	22.80	7.30	48	3	NPC-039	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	18.10	7.30	48	3	NPC-BM	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	20.00	6.00	48	3		Human normal nasopharyngeal	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	19.50	7.30	72	3	NPC-039	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	17.80	7.30	72	3	NPC-BM	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	20.00	6.00	72	3		Human normal nasopharyngeal	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	74.94	2.62	24	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	34.36	2.89	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	

33921703	2021	Klimek K	MTT	20.85	2.99	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Purchased	[75]
			MTT	102.59	3.48	72	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	48.67	1.35	72	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	155.70	4.23	24	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Cones)	
			MTT	45.17	3.58	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	Hop/crude extract	Isolated (Cones)	
			MTT	66.48	2.97	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Hop/crude extract	Isolated (Cones)	
			MTT	26.27	1.56	72	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Hop/crude extract	Isolated (Cones)	
			MTT	104.30	4.16	72	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Cones)	
32986415	2020	Hitzman R	MTT	76.00	6.91	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[76]
			MTT	32.80	0.40	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Hop/crude extract	Isolated (Spent hop)	
			MTT	105.00	6.91	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	6-prenylnaringenin	Purchased	
			MTT	115.00	8.20	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	8-prenylnaringenin	Purchased	
32509787	2020	Yin S	MTT	7.90	7.30	24	3	KYSE30	Human esophageal cancer	Esophagus	Xanthohumol	Purchased	[77]

			MTT	3.10	7.30	48	3	KYSE30	Human esophageal cancer	Esophagus	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	2.60	7.30	72	3	KYSE30	Human esophageal cancer	Esophagus	Xanthohumol	Purchased	
32422304	2020	Ho K	MTT	60.00	7.30	24	3	U87-MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	[78]
			MTT	68.10	7.30	24	3	A172	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	
32290112	2020	Scagliarini A	Crystal Violet	39.00	6.48	24	3	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	[79]
			Crystal Violet	12.00	2.8	48	3	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	22.00	6.49	48	3	SW480	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	12.00	3.57	48	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	10.00	1.75	72	3	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	20.00	3.3	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	7.00	1.38	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	8.8	1.16	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	18.9	4.6	72	4	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	

31820895	2019	Stompor M	SRB	8.7	1.3	72	4	4T1	Murine breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	[80]
			SRB	21.5	2.7	72	4	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	12.6	8.8	72	4	BALB/3T3	Murine normal fibroblasts	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	21.1	4.3	72	4	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
31527518	2019	Lu X	MTT	39.82	1.50	24	3	K562	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	[81]
			MTT	19.56	0.77	48	3	K562	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	4.43	1.20	72	3	K562	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	10.00	1.50	72	3	K562/ADR	Human leukemia adriamycin-resistant	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	
31386885	2019	Sławińska-Brych A	MTT	50.12	7.30	48	3	U266	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol	Purchased	[82]
			MTT	21.85	7.30	48	3	RPMI8226	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	38.40	7.30	96	3	U266	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	8.24	7.30	96	3	RPMI8226	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	166.68	8.20	24	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Purchased	

31278947	2019	Koosha S	MTT	70.00	2.90	48	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Purchased	[83]
			MTT	58.49	4.10	72	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Purchased	
31034931	2019	Krajnović T	Crystal violet	42.00	5.19	48	3	B16-F10	Murine melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	[84]
			MTT	30.00	4.05	48	3	B16-F10	Murine melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	
			MTT	7.10	0.80	48	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	29.40	2.60	48	3	MG-63	Human osteosarcoma	Bone	Xanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	19.50	0.50	48	3	WI-38	Human normal lung fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	9.60	0.50	48	3	J774	Mouse monocyte macrophage	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	31.40	8.10	72	3	MG-63	Human osteosarcoma	Bone	Hop/crude extract	Isolated (Cones, Leaves, Stems)	
			MTT	6.80	2.50	72	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Hop/crude extract	Isolated (Cones, Leaves, Stems)	
			MTT	7.60	0.10	72	3	WI-38	Human normal lung fibroblast	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Cones, Leaves, Stems)	
			MTT	19.70	2.80	72	3	J774	Mouse monocyte macrophage	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Cones, Leaves, Stems)	

30875854	2019	Bocquet L										Leaves, Stems)	[85]
			MTT	2.60	0.10	48	3	WI-38	Human normal lung fibroblast	No cancer	Lupulone	Isolated (Cones)	
			MTT	3.60	0.10	48	3	J774	Mouse monocyte macrophage	No cancer	Lupulone	Isolated (Cones)	
			MTT	2.90	0.50	48	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Lupulone	Isolated (Cones)	
			MTT	10.40	0.40	48	3	MG-63	Human osteosarcoma	Bone	Lupulone	Isolated (Cones)	
			MTT	29.00	2.30	48	3	WI-38	Human normal lung fibroblast	No cancer	Humulone	Isolated (Cones)	
			MTT	31.70	0.30	48	3	J774	Mouse monocyte macrophage	No cancer	Humulone	Isolated (Cones)	
			MTT	178.50	2.50	48	3	WI-38	Human normal lung fibroblast	No cancer	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	28.50	1.00	48	3	J774	Mouse monocyte macrophage	No cancer	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	65.90	2.90	48	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	116.20	3.30	48	3	MG-63	Human osteosarcoma	Bone	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
30875365	2019	Roehrer S	MTS	12.25	6.91	48	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Crude extract)	[86]
			MTS	8.80	7.30	96	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Crude extract)	

30857300	2019	Logan I E	SRB	40.8	1.4	24	5	HCT116	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	[87]
			SRB	50.2	1.4	24	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	25.4	1.1	24	5	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	37.2	1.5	24	5	Huh7	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	10.84	0.32	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	8.46	3.19	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	7.99	2.77	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	9.42	0.25	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	2.06	1.03	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	8.21	0.83	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	6.49	2.14	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	8.61	1.11	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	9.57	4.23	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	

			SRB	55.95	27.31	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	43.25	4.37	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	62.64	19.54	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	16.01	3.74	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	64.61	17.07	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	44.16	14.71	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	81.73	17.68	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	79.56	8.89	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	75.53	29.79	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	13.69	5.16	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	6-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	

			SRB	110.06	32.95	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	6-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	49.53	7.36	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	63.81	7.27	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	26.71	9.7	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	89.84	3.42	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	25.91	8.32	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	66.37	10.14	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	60.58	6.66	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	51.36	11.31	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	23.91	10.86	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	8-prenyl naringenin	Synthesized from isolated	

30423918	2018	Bartmańs ka A	SRB	90.72	19.8	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	[88]
			SRB	16.73	0.88	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	43.34	10.32	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	26.75	6.44	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	30.59	1	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	7.93	1.65	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	11.65	1.44	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	59.17	5.73	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	53.24	10.59	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	12.5	5.65	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	72.12	21.66	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	130.79	6.11	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Naringenin	Purchased	
			SRB	166.09	82.44	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Naringenin	Purchased	

			SRB	104.53	48.31	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	Naringenin	Purchased	
			SRB	130.8	28.19	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Naringenin	Purchased	
			SRB	100.05	4.77	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Naringenin	Purchased	
			SRB	109.23	16.98	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Naringenin	Purchased	
			SRB	133.66	12.92	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Naringenin	Purchased	
			SRB	171.23	28.78	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Naringenin	Purchased	
			SRB	117.24	32.27	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	Naringenin	Purchased	
			SRB	187.1	72.41	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Naringenin	Purchased	
			SRB	10.07	2.31	72	5	MCF-7	Human breast cancer	Breast	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	10.02	3.26	72	5	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	7.27	3.05	72	5	T-47D	Human breast cancer	Breast	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	12.23	2.99	72	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	

			SRB	1.8	0.64	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	11.59	3.36	72	5	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	12.96	4.2	72	5	DU145	Human prostate cancer	Prostate	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	16.27	5.22	72	5	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	14.17	4.24	72	5	HLMEC	Human lung microvascular endothelial	No cancer	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	72.05	8.55	72	5	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
30272303	2018	Wei S	MTS	16.04	7.30	24	3	AGS	Human gastric cancer	Gastric	Xanthohumol	Purchased	[89]
			MTS	111.16	7.30	24	3	SGC-7901	Human gastric cancer	Gastric	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	35.81	7.30	24	3	MGC-803	Human gastric cancer	Gastric	Xanthohumol	Purchased	
			EdU	8.00	7.30	24	3	AGS	Human gastric cancer	Gastric	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	285.26	6.00	24	3	GES-1	Human normal gastric	No cancer	Xanthohumol	Purchased	

30240731	2018	Carvalho D O	SRB	85.5	8.92	24	3	TPC-1	Human thyroid cancer	Thyroid	Xanthohumol	Purchased	[90]
			SRB	59	8.92	48	3	TPC-1	Human thyroid cancer	Thyroid	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	48.5	8.92	72	3	TPC-1	Human thyroid cancer	Thyroid	Xanthohumol	Purchased	
29747239	2018	Ho K	MTT	53.70	7.30	24	3	M059K	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	[91]
			MTT	55.60	7.30	24	3	U87-MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	
29597299	2018	Popłoński J	SRB	8.1	0.8	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	[92]
			SRB	10.1	1.1	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	7	1.5	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
29422966	2018	Sun Z	MTT	39.40	6.91	24	6	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[93]
			MTT	33.30	7.30	24	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	19.60	6.91	48	6	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	21.50	7.30	48	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	61.10	6.00	48	6	h-TERT-BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	135.30	6.00	48	6	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	

29121426	2018	Saito K	WST-1	17.00	7.30	72	6	BxPC-3	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	[94]
			WST-1	15.90	7.30	72	6	MIA PaCa-2	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
			WST-1	12.90	7.30	72	6	AsPC-1	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
28803257	2017	Stompor M	SRB	30	3.8	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	[95]
			SRB	29.7	4.2	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	8.96	1.5	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	26.8	4	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	16	3.6	72	3	MES-SA	Human uterine cancer	Uterus	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	30.4	4.1	72	3	MES-SA	Human uterine cancer	Uterus	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	37.1	3.8	72	3	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			XTT	15.60	4.05	72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			MTT	81.45	6.91	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	78.33	7.30	24	3	MCF-7/ADR	Human breast cancer doxorubicin-resistant	Breast	Xanthohumol	Purchased	

28036030	2016	Liu M	MTT	34.02	3.45	48	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[96]
			MTT	33.71	3.12	48	3	MCF-7/ADR	Human breast cancer doxorubicin-resistant	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	11.22	0.95	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	11.37	1.15	72	3	MCF-7/ADR	Human breast cancer doxorubicin-resistant	Breast	Xanthohumol	Purchased	
27494895	2016	Gallo C	MTT	18.30	6.00	96	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Xanthohumol	Purchased	[97]
27487563	2016	Chen P	MTT	64.80	7.30	24	3	U87-MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	[98]
			MTT	19.70	7.30	48	3	U87-MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	13.10	7.30	72	3	U87-MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	4.10	11.60	72	6	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Tetrahydro Iso-Alpha Acids	Isolated (hop extract)	
			Crystal Violet	20.60	11.60	72	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Tetrahydro Iso-Alpha Acids	Isolated (hop extract)	
			Crystal Violet	15.30	11.60	72	6	MCF-7	Human breast cancer	Breast	α -acids	Isolated (hop extract)	
			Crystal Violet	15.70	11.60	72	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	α -acids	Isolated (hop extract)	

27190515	2016	Lempereur M	Crystal Violet	13.10	11.60	72	6	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Iso- α -acids	Isolated (hop extract)	[99]
			Crystal Violet	13.70	11.60	72	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Iso- α -acids	Isolated (hop extract)	
			Crystal Violet	29.90	11.60	72	6	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Dihydro-iso-alpha acids	Isolated (hop extract)	
26842182	2014	Yoo Y B	MTT	16.80	7.30	48	4	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[100]
26784390	2016	Krajnović T	Crystal Violet	15.77	1.74	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Purchased	[101]
			Crystal Violet	9.97	2.32	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	48.30	11.6	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	8-prenylnaringenin	Purchased	
			Crystal Violet	38.55	8.84	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	8-prenylnaringenin	Purchased	
			Crystal Violet	24.18	1.43	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	
			Crystal Violet	21.88	5.19	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	
			MTT	15.00	1.15	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	8.70	0.99	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	27.80	3.82	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	8-prenylnaringenin	Purchased	

			MTT	40.85	0.78	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	8-prenylnaringenin	Purchased	
			MTT	22.90	0.78	48	3	A375	Human melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	
			MTT	22.15	4.05	48	3	B16	Murine melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Purchased	
26664015	2015	Yong W K	SRB	74.06	3.43	24	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Purchased	[102]
			SRB	25.48	0.52	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	149.2	8.59	48	3	MRC-5	Human normal lung fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	13.5	1.42	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	94.38	3.07	72	3	MRC-5	Human normal lung fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
26453927	2015	Zhang B	CCK-8	7.90	7.30	48	3	HeLa	Human cervical cancer	Cervix	Xanthohumol	Purchased	[103]
			CCK-8	8.60	2.99	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Purchased	
			CCK-8	32.00	6.00	48	3	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			CCK-8	53.60	4.05	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Isoxanthohumol	Purchased	
			CCK-8	46.30	4.05	48	3	HeLa	Human cervical cancer	Cervix	Isoxanthohumol	Purchased	

26297991	2015	Sławińska -Brych A	MTT	12.30	7.30	48	3	RK33	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	[104]
			MTT	22.50	7.30	48	3	RK45	Human neck cancer	Neck	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	100.00	6.00	48	3	HSF	Human normal skin fibroblast	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	105.00	6.00	48	3	OLN93	Rat oligodendroglia	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
26211581	2015	Jiang W	MTS	10.00	7.30	24	3	PANC-1	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	[105]
			MTS	27.70	7.30	24	3	BxPC-3	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	8.10	7.30	48	3	PANC-1	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	9.10	7.30	48	3	BxPC-3	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	5.60	7.30	72	3	BxPC-3	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	4.40	7.30	72	3	PANC-1	Human pancreatic cancer	Pancreas	Xanthohumol	Purchased	
26201061	2015	Zenger K	MTT	65.00	4.00	24	3	HSC	Human hepatic stellate	No cancer	Xanthohumol	Purchased	[106]
25949267	2015	Yong W K	SRB	59.96	2.76	24	2	Ca Ski	Human cervical cancer	Cervix	Xanthohumol	Purchased	[107]
			SRB	34.01	1.6	48	2	Ca Ski	Human cervical cancer	Cervix	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	20.08	1.58	72	2	Ca Ski	Human cervical cancer	Cervix	Xanthohumol	Purchased	

24168111	2013	Mouratidis P	MTT	10.50	0.50	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone	Purchased	[108]
			MTT	9.00	0.50	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone	Purchased	
			MTT	5.00	0.50	72	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone	Purchased	
			MTT	5.00	0.50	72	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone	Purchased	
24103906	2014	Boncler M	MTT	9.60	0.40	24	4	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Spent hop)	[109]
23466227	2013	Tronina T	SRB	10.95	1.03	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	[110]
			SRB	91.31	8.92	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	10.67	1.06	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
23434138	2013	Tronina T	SRB	10.95	1.03	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	[111]
			SRB	91.31	8.92	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	10.67	1.06	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Spent hop)	
			SRB	26.54	12.68	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	88.82	4.15	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	71.32	19.59	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	

			SRB	9.15	0.62	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	74.41	23.44	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	14.73	3.88	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	α,β -dihydroxanthohumol	Synthesized from isolated	
23361834	2013	Allsopp P	MTT	70.00	8.20	24	3	CaCo-2	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	[112]
			MTT	55.00	4.05	24	3	CaCo-2	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
23246576	2013	Kang Y	MTT	16.60	6.91	24	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[113]
			MTT	18.00	7.30	24	3	MCF-7/ADR	Human breast cancer doxorubicin-resistant	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	35.20	7.30	24	3	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
22138251	2012	Viegas O	MTT	117.10	3.48	24	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	[114]
21997247	2012	Hemachandra L P	MTT	11.00	0.50	24	3	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	Hop/crude extract	Isolated (Spent hop)	[115]
			MTS	26.50	7.30	72	3	LNCaP	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Purchased	

20944105	2010	Deeb D	MTS	29.00	7.30	72	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Purchased	[116]
			MTS	31.00	7.30	72	3	C4-2	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Purchased	
			MTS	25.10	7.30	72	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Purchased	
20803553	2010	Negrão R	MTT	24.00	6.00	24	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Xanthohumol	Purchased	[117]
			MTT	12.00	6.00	24	3	HASMC	Human aortic smooth muscle	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	28.00	4.05	24	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Isoxanthohumol	Purchased	
20633549	2010	Wesołowska O	SRB	33	3.42	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Purchased	[118]
			SRB	55	3.42	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Purchased	
20335224	2010	Strathmann J	SRB	6.7	0.2	72	3	BPH-1	Human benign prostatic hyperplasia	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Hop ethanol extract)	[119]
20043079	2010	Dorn C	XTT	20.00	5.00	72	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	[120]
			XTT	15.00	5.00	72	3	Huh7	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	
19035642	2008	Mendes V	SRB	26	27.31	24	3	3T3-L1	Murine preadipocyte	No cancer	Xanthohumol	Purchased	[121]
			SRB	12	27.31	48	3	3T3-L1	Murine preadipocyte	No cancer	Xanthohumol	Purchased	

			SRB	17	27.31	72	3	3T3-L1	Murine preadipocyte	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
18814205	2008	Ho Y	MTT	166.00	3.00	24	3	HA22T/VGH	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Hop extract)	[122]
			MTT	108.00	5.00	24	3	Hep3B	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Hop extract)	
			MTT	211.00	6.00	24	3	AML12	Murine normal liver	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Hop extract)	
18790751	2008	Monteghirfo S	MTT	10.00	1.50	48	3	K562	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	[123]
			MTT	16.00	1.50	48	3		Mononuclear cells from CML patients	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	
			MTT	5.40	1.50	72	3	K562	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol	Purchased	
18587269	2008	Koo J	MTT	8.60	1.15	24	3	B16-F10	Murine melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Purchased	[124]
18087812	2007	Lee S O	SRB	12.13	3.43	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol	Isolated (Pellets)	[125]
			SRB	10.15	8.92	48	3	HCT15	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Pellets)	
			SRB	14.39	8.92	48	3	SK-MEL-2	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol	Isolated (Pellets)	
			SRB	16	1.03	48	3	SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol	Isolated (Pellets)	
			SRB	100.17	3.42	48	3	HCT15	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	

			SRB	66.39	11.31	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	102.23	11.31	48	3	SK-MEL-2	Human melanoma	Melanoma	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	75.2	10.14	48	3	SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	8-prenylnaringenin	Synthesized from isolated	
			SRB	63.48	4	48	3	HCT15	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	77.59	4.2	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	40.34	19.59	48	3	SK-MEL-2	Human melanoma	Melanoma	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
			SRB	27.93	1.65	48	3	SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	Isoxanthohumol	Synthesized from isolated	
17874298	2007	Yang J	MTS	75.00	14.14	24	8	3T3-L1	Murine preadipocyte	No cancer	Xanthohumol	Purchased	[126]
			MTS	53.00	9.90	48	8	3T3-L1	Murine preadipocyte	No cancer	Xanthohumol	Purchased	
17643984	2007	Monteiro R	SRB	7.1	4.6	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[127]
			SRB	22.6	9.7	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	8-prenylnaringenin	Purchased	
			SRB	41	12.68	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Purchased	

17590382	2007	Plazar J	MTT	75.00	3.48	24	5	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol	Purchased	[128]
16678392	2006	Delmulle L	WST-1	13.20	1.10	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Cones)	[129]
			WST-1	12.30	1.10	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Cones)	
			WST-1	18.40	1.20	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin	Isolated (Cones)	
			WST-1	29.10	1.10	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin	Isolated (Cones)	
			WST-1	33.50	1.00	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylnaringenin	Isolated (Cones)	
			WST-1	43.10	1.20	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylnaringenin	Isolated (Cones)	
			WST-1	45.20	1.10	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol	Isolated (Cones)	
			WST-1	47.40	1.10	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol	Isolated (Cones)	
			WST-1	49.90	1.00	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
			WST-1	53.80	1.10	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Desmethylxanthohumol	Isolated (Cones)	
			MTT	24.00	7.30	48	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol	Isolated (Cones)	

16563612	2007	Colgate E C	MTT	5.00	6.00	48	4	BPH-1	Human benign prostatic hyperplasia	No cancer	Xanthohumol	Isolated (Cones)	[130]
16097803	2005	Dietz B M	Crystal Violet	30.70	7.6	48	3	Hepa 1c1c7	Murine liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Spent Nugget)	[131]
			Crystal Violet	30.70	2.9	48	3	Hepa 1c1c7	Murine liver cancer	Liver	Isoxanthohumol	Isolated (Spent Nugget)	
15995977	2005	Pan L	SRB	4.1	0.9	24	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Hop ethanolic extract)	[132]
			SRB	3.6	0.6	48	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Hop ethanolic extract)	
			SRB	2.6	0.1	72	3	HCT116	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Isolated (Hop ethanolic extract)	
12481418	2002	Gerhause r C	Crystal Violet	7.40	1.4	48	3	Hepa 1c1c7	Murine liver cancer	Liver	Xanthohumol	Isolated (Hop ethanolic extract)	[133]
			Crystal Violet	29.90	1.9	48	3	Hepa 1c1c7	Murine liver cancer	Liver	Isoxanthohumol	Isolated (Hop ethanolic extract)	
			SRB	13.3	1.16	48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	46	8.92	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	0.52	1.03	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol	Purchased	

10418944	1999	Miranda C L	SRB	3.47	1.16	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol	Purchased	[134]
			SRB	51.1	8.92	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	5.22	1.03	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol	Purchased	
			SRB	15.3	12.68	48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Purchased	
			SRB	62.5	4.15	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Purchased	
			SRB	18	1.65	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Isoxanthohumol	Purchased	
			SRB	4.69	12.68	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol	Purchased	
			SRB	25.7	1.65	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Isoxanthohumol	Purchased	
			SRB	57.8	4.15	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol	Purchased	

3.3. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης σε επίπεδο χημικών ενώσεων

Αρχικά, εξετάζουμε την αντιπολλαπλασιαστική δράση που έχει η κάθε χημική ένωση στον αντίστοιχο τύπο καρκίνου. Οι μελέτες ομαδοποιήθηκαν πρώτα με βάση την μέθοδο που χρησιμοποιούν για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, αλλά και τον χρόνο επώασης της κάθε χημικής ένωσης με την κυτταρική καλλιέργεια. Πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων με το στατιστικό πακέτο STATA και σαν κανόνας απόφασης πρέπει να ισχύει $p \leq 0.05$ για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό. Η εντολή που χρησιμοποιήσαμε έχει την παρακάτω μορφή:

```
metan ic50 stde if assay=="SRB" & compounds=="Xanthohumol" & hours==24,  
by(type_of_cancer) random label(namevar=author, yearvar=year)
```

Τρέξαμε την εντολή με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς που αφορούν τις τρεις μεταβλητές: μέθοδος μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας (SRB, Tetrazolium dye, CV), χημική ένωση και χρόνος επώασης. Επιπλέον, τα αποτελέσματα είναι ομαδοποιημένα με βάση τον τύπο του καρκίνου. Έπειτα, καταγράφηκε ο δείκτης IC50 που προέκυψε από την μετα-ανάλυση, το πλήθος των μελετών που συμπεριελήφθησαν για την εξαγωγή αυτού του αποτελέσματος, το διάστημα εμπιστοσύνης καθώς και ο δείκτης p-value για την στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, επαναλάβουμε την ίδια διαδικασία, δηλαδή τρέξαμε τις ίδιες εντολές με τους ίδιους συνδυασμούς, αντικαθιστώντας αυτή την φορά το *by(type_of_cancer)* με το *by(cancer_or_non)*. Η μεταβλητή *cancer_or_non* δύναται να λάβει τις τιμές 1 ή 0 ανάλογα εάν ο τύπος κυττάρων αντιστοιχεί σε καρκίνο ή όχι. Με τον τρόπο αυτόν έχουμε την δυνατότητα να παρατηρήσουμε τον τρόπο με τον οποίο μια χημική ένωση επιδρά στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα κανονικά. Τα τελικά αποτελέσματα όλων των συνδυασμών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης τυχαίων επιδράσεων. Παρουσιάζεται το συνολικό μέγεθος επίδρασης (IC50) μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης και την τιμή p-value, που προέκυψαν από την αντίστοιχη μετα-ανάλυση για μια συγκεκριμένη μέθοδο, χημική ένωση, τύπο καρκίνου και χρόνου επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση. Τέλος, φαίνεται ο αριθμός των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μετα-ανάλυσης.

Assay	Compound	Time	Number of studies	Type of cancer	IC50	95% CI		p-value
						lower bound	upper bound	
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	2/	Neck	50.800	40.608	60.992	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	4/	Liver	116.528	73.415	159.641	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	7/	Breast	48.974	29.381	68.567	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	5/	Glioblastoma	60.440	55.131	65.749	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	4/	Gastric	42.752	-3.383	88.888	0.069
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	2/	Pancreas	18.850	1.504	36.196	0.033
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	8/	No cancer	97.760	40.404	155.116	0.001
Tetrazolium dye	Xanthohumol	24	28/	Cancerous lines	54.075	36.493	71.657	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	6/	Breast	23.419	16.211	30.627	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	2/	Melanoma	11.841	5.667	18.015	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	4/	Neck	18.925	14.112	23.738	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	3/	Leukemia	15.219	9.545	20.893	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	2/	Myeloma	35.985	8.281	63.689	0.011
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	3/	Prostate	13.862	11.355	16.369	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	2/	Pancreas	8.600	2.759	14.441	0.004
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	10/	No cancer	53.894	42.058	65.730	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	48	28/	Cancerous lines	17.638	14.998	20.278	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	3/	Breast	18.768	10.257	27.278	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	5/	Pancreas	11.863	7.163	16.563	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	2/	Neck	18.650	12.809	24.491	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	3/	Leukemia	6.587	3.263	9.911	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	3/	Liver	45.891	-15.252	107.034	0.141

Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	4/	Prostate	27.900	23.770	32.030	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	2/	No cancer	34.534	6.440	62.627	0.016
Tetrazolium dye	Xanthohumol	72	23/	Cancerous lines	19.848	13.417	26.279	0.000
Tetrazolium dye	Xanthohumol	96	2/	Myeloma	23.320	-6.236	52.876	0.122
Tetrazolium dye	Xanthohumol	96	3/	Cancerous lines	18.480	-1.044	38.004	0.064
Tetrazolium dye	Hop/crude extract	24	3/	No cancer	57.899	41.202	74.595	0.000
Tetrazolium dye	Hop/crude extract	72	2/	Liver	16.568	-2.512	35.648	0.089
Tetrazolium dye	Hop/crude extract	72	3/	No cancer	43.804	-0.167	87.775	0.051
Tetrazolium dye	Hop/crude extract	72	5/	Cancerous lines	35.229	15.202	55.257	0.001
Tetrazolium dye	6-prenylnaringenin	48	2/	Prostate	23.754	13.268	34.239	0.000
Tetrazolium dye	6-prenylnaringenin	48	2/	Cancerous lines	23.754	13.268	34.239	0.000
Tetrazolium dye	8-prenylnaringenin	24	2/	Colon	118.340	23.595	213.085	0.014
Tetrazolium dye	8-prenylnaringenin	24	3/	Cancerous lines	117.227	62.482	171.971	0.000
Tetrazolium dye	8-prenylnaringenin	48	2/	Melanoma	34.504	21.720	47.288	0.000
Tetrazolium dye	8-prenylnaringenin	48	2/	Prostate	38.292	28.885	47.700	0.000
Tetrazolium dye	8-prenylnaringenin	48	5/	Cancerous lines	43.051	35.571	50.531	0.000
Tetrazolium dye	Isoxanthohumol	48	3/	Melanoma	24.711	20.569	28.852	0.000
Tetrazolium dye	Isoxanthohumol	48	2/	Prostate	46.300	44.144	48.456	0.000
Tetrazolium dye	Isoxanthohumol	48	7/	Cancerous lines	38.222	27.503	48.941	0.000
Tetrazolium dye	Lupulone	48	2/	Prostate	9.750	8.280	11.220	0.000
Tetrazolium dye	Lupulone	48	2/	No cancer	3.100	2.120	4.080	0.000
Tetrazolium dye	Lupulone	48	4/	Cancerous lines	8.201	4.773	11.630	0.000
Tetrazolium dye	Lupulone	72	2/	Prostate	5.000	4.600	5.400	0.000
Tetrazolium dye	Lupulone	72	2/	Cancerous lines	5.000	4.600	5.400	0.000
Tetrazolium dye	Humulone	48	2/	No cancer	30.671	28.101	33.241	0.000
Tetrazolium	Desmethylxanthohumol	48	2/	Prostate	51.841	48.019	55.663	0.000

dye								
Tetrazolium dye	Desmethylxanthohumol	48	4/	Cancerous lines	71.347	53.769	88.925	0.000
Tetrazolium dye	Desmethylxanthohumol	48	2/	No cancer	103.494	-43.503	250.491	0.168
SRB	Xanthohumol	24	3/	Colon	31.698	2.694	60.703	0.032
SRB	Xanthohumol	24	2/	Liver	31.291	19.727	42.855	0.000
SRB	Xanthohumol	24	8/	Cancerous lines	46.798	33.108	60.488	0.000
SRB	Xanthohumol	48	2/	Lung	18.949	5.869	32.028	0.005
SRB	Xanthohumol	48	3/	Colon	19.748	-6.228	45.724	0.136
SRB	Xanthohumol	48	2/	Ovarian	8.257	-6.913	23.427	0.286
SRB	Xanthohumol	48	2/	No cancer	81.416	-53.028	215.860	0.235
SRB	Xanthohumol	48	11/	Cancerous lines	20.795	13.273	28.317	0.000
SRB	Xanthohumol	72	10/	Breast	9.705	8.637	10.773	0.000
SRB	Xanthohumol	72	5/	Colon	31.200	26.040	36.361	0.000
SRB	Xanthohumol	72	2/	Ovarian	5.141	-0.886	11.168	0.095
SRB	Xanthohumol	72	5/	Prostate	8.799	7.240	10.358	0.000
SRB	Xanthohumol	72	7/	No cancer	31.031	2.447	59.615	0.033
SRB	Xanthohumol	72	26/	Cancerous lines	14.603	12.574	16.632	0.000
SRB	Xanthohumol	96	3	Cancerous lines	15.526	8.566	22.487	0.000
SRB	6-prenylNaringenin	72	3/	Breast	39.413	16.317	62.509	0.001
SRB	6-prenylNaringenin	72	2/	Ovarian	62.689	25.874	99.503	0.001
SRB	6-prenylNaringenin	72	2/	Prostate	79.230	71.764	86.697	0.000
SRB	6-prenylNaringenin	72	2/	No cancer	60.776	-33.640	155.192	0.207
SRB	6-prenylNaringenin	72	8/	Cancerous lines	57.664	38.862	76.466	0.000
SRB	8-prenylNaringenin	48	4/	Cancerous lines	86.399	69.265	103.532	0.000
SRB	8-prenylNaringenin	72	4/	Breast	40.731	21.174	60.288	0.000
SRB	8-prenylNaringenin	72	3/	Colon	59.297	25.149	93.445	0.001
SRB	8-prenylNaringenin	72	2/	Ovarian	46.057	6.407	85.707	0.023
SRB	8-prenylNaringenin	72	2/	Prostate	56.876	48.017	65.735	0.000

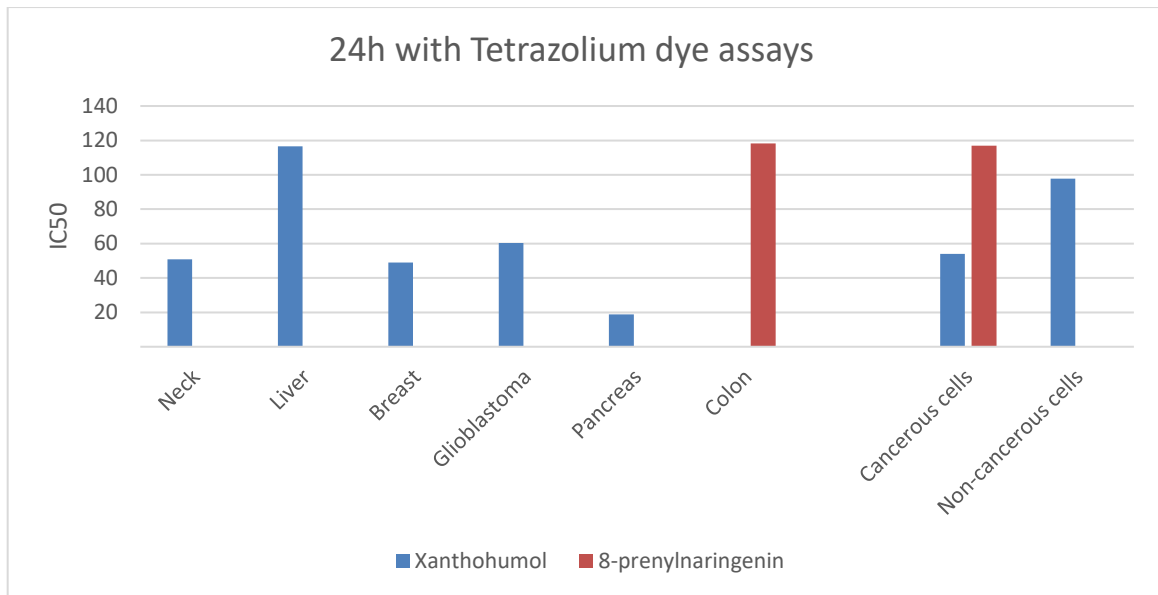
SRB	8-prenylNaringenin	72	2/	No cancer	56.905	-8.563	122.37 2	0.088
SRB	8-prenylNaringenin	72	11/	Cancerous lines	49.567	34.416	64.719	0.000
SRB	Isoxanthohumol	48	2/	Colon	62.938	59.913	65.963	0.000
SRB	Isoxanthohumol	48	2/	Ovarian	22.954	13.222	32.685	0.000
SRB	Isoxanthohumol	48	7/	Cancerous lines	43.898	26.905	60.892	0.000
SRB	Isoxanthohumol	72	6/	Breast	30.379	21.076	39.682	0.000
SRB	Isoxanthohumol	72	4/	Colon	38.728	16.871	60.586	0.001
SRB	Isoxanthohumol	72	2/	Ovarian	9.807	6.162	13.453	0.000
SRB	Isoxanthohumol	72	3/	Prostate	58.521	52.079	64.963	0.000
SRB	Isoxanthohumol	72	2/	Uterus	23.155	9.044	37.267	0.001
SRB	Isoxanthohumol	72	3/	No cancer	38.498	15.589	61.406	0.000
SRB	Isoxanthohumol	72	18/	Cancerous lines	33.498	26.957	40.038	0.000
SRB	Isoxanthohumol	96	3/	Cancerous lines	29.950	4.381	55.519	0.022
SRB	Naringenin	72	3/	Breast	129.24 4	113.620	144.86 7	0.000
SRB	Naringenin	72	2/	Ovarian	101.74 7	94.763	108.73 2	0.000
SRB	Naringenin	72	2/	Prostate	150.68 5	114.029	187.34 1	0.000
SRB	Naringenin	72	2/	No cancer	146.15 5	78.716	213.59 4	0.000
SRB	Naringenin	72	8/	Cancerous lines	127.14 9	110.496	143.80 3	0.000
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	4/	Breast	9.173	8.586	9.760	0.000
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	2/	Colon	42.230	-18.668	103.12 8	0.174
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	2/	Ovarian	6.584	-3.008	16.175	0.179
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	3/	Prostate	14.431	12.141	16.721	0.000
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	2/	No cancer	43.015	-13.706	99.736	0.137
SRB	α,β -dihydroxanthohumol	72	11/	Cancerous lines	11.577	8.222	14.932	0.000
Crystal Violet	Xanthohumol	48	3/	Colon	14.245	9.573	18.918	0.000
Crystal Violet	Xanthohumol	48	2/	Liver	18.651	-4.169	41.471	0.109
Crystal Violet	Xanthohumol	48	2/	Melanoma	12.938	7.255	18.620	0.000

Crystal Violet	Xanthohumol	48	7/	Cancerous lines	14.384	10.435	18.334	0.000
Crystal Violet	Xanthohumol	72	3/	Colon	12.058	6.305	17.812	0.000
Crystal Violet	Xanthohumol	72	3/	Cancerous lines	12.058	6.305	17.812	0.000
Crystal Violet	8-prenylnaringenin	48	2/	Melanoma	42.461	33.095	51.827	0.000
Crystal Violet	Isoxanthohumol	48	2/	Liver	30.140	28.342	31.939	0.000
Crystal Violet	Isoxanthohumol	48	3/	Melanoma	29.182	18.676	39.689	0.000
Crystal Violet	Isoxanthohumol	48	5/	Cancerous lines	29.477	24.686	34.268	0.000

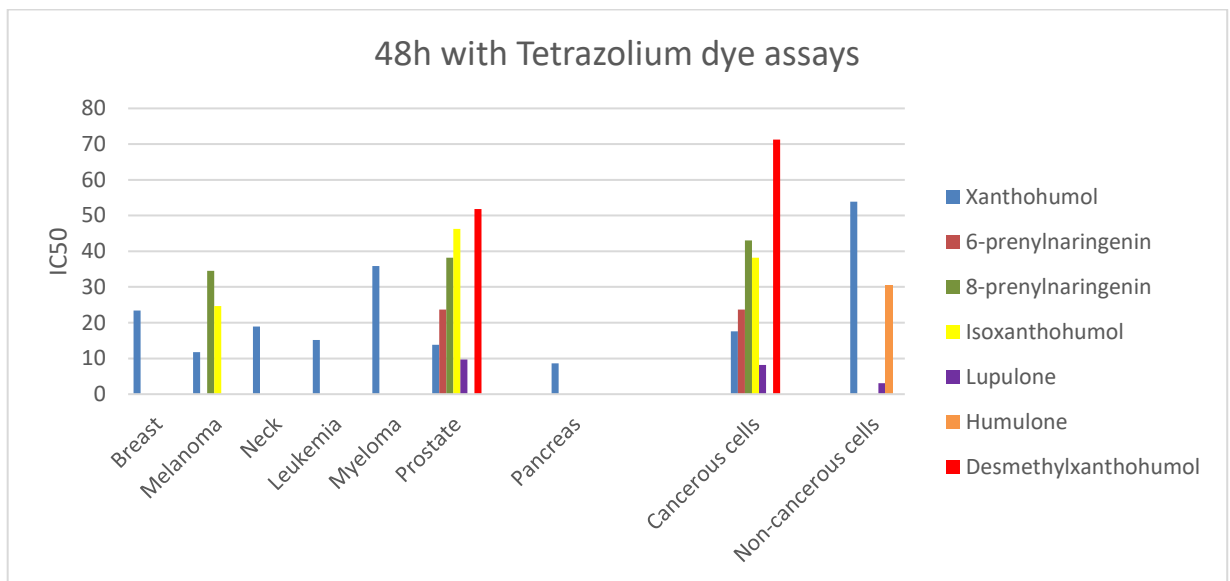
Για τον εποπτικό έλεγχο της δράσης της εκάστοτε χημικής ένωσης στους διαφόρους τύπου καρκίνου για τις μεθόδους SRB, Tetrazolium dye, CV και για κάθε ένα από τα χρονικά διαστήματα (24, 48, 72 ώρες), δημιουργήθηκαν γραφήματα με τις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση.

3.3.1. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για τις μεθόδους χρώσεων Τετραζολίου

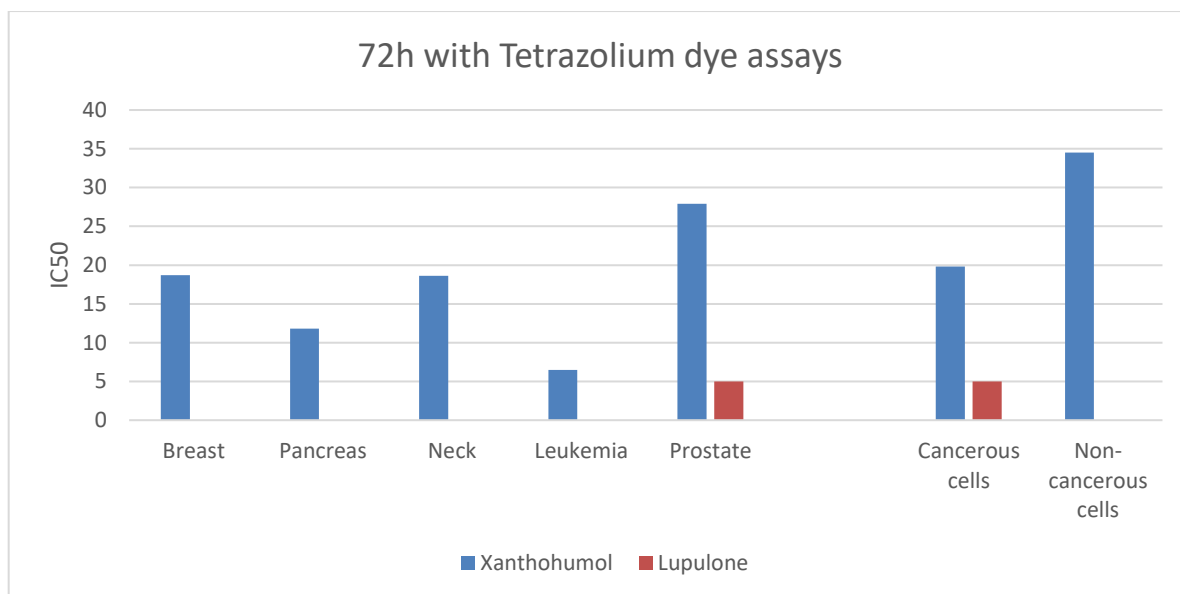
Αρχικά, παρατηρούμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων από τις μεθόδους Tetrazolium dye, για τις διάφορες χημικές ενώσεις στους αντίστοιχους τύπους καρκίνου, για τις 24, 48 και 72 ώρες επώασης (εικόνες 20, 21, 22).



Εικόνα 20- Σύγκριση τιμών IC50 που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Tetrazolium dye για τις 24 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι τιμές IC50 της ξανθοχουμόλης, ενώ με κόκκινο της 8-πρενυλναρινγενίνης.



Εικόνα 21- Σύγκριση τιμών IC50 που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Tetrazolium dye για τις 48 ώρες επώασης. Με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τις διάφορες χημικές ενώσεις του λυκίσκου.



Εικόνα 22- Σύγκριση τιμών IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Tetrazolium dye για τις 72 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για την ξανθοχουμόλη, ενώ με κόκκινο για την λουπουλόνη.

Παρατηρούμε ότι η χημική ένωση ξανθοχουμόλη φαίνεται να έχει αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Μερικά από τα αποτελέσματα τα οποία είναι άξια αναφοράς είναι στην λευχαιμία, με την χρήση των μεθόδων χρώσεων τετραζολίου στις 72 ώρες, όπου παρουσιάζει IC₅₀ ίσο με 6.5 μM (95% CI: 3.2, 9.9) σε 3 μελέτες. Στον καρκίνο του παγκρέατος, στις ίδιες συνθήκες, το IC₅₀ ανέρχεται στα 11.8 μM (95% CI: 7.1, 16.5) σε 5 μελέτες, ενώ στον καρκίνο του μαστού εντοπίζεται στα 18.7 μM (95% CI: 10.2, 27.2) σε 3 μελέτες.

Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από τις μέχρι τώρα αναλύσεις είναι το γεγονός ότι ο χρόνος επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στο τελικό αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, όσο περισσότερος χρόνος παρέλθει τόσο πιο χαμηλές τιμές IC₅₀ παρατηρούνται. Για παράδειγμα, η ξανθοχουμόλη, με τις μεθόδους χρώσεων τετραζολίου για τον καρκίνο του μαστού, στις 24 ώρες, η τιμή IC₅₀ είναι 48.9 μM (95% CI: 29.3, 68.5) σε 7 μελέτες, στις 48 ώρες 23.4 μM (95% CI: 16.2, 30.6) σε 6 μελέτες και στις 72 ώρες φτάνει στα 18.7 μM (95% CI: 10.2, 27.2) σε 3 μελέτες.

Η ξανθοχουμόλη φαίνεται να έχει την ικανότητα να επιδρά πιο αποτελεσματικά στα καρκινικά κύτταρα, ανεξαρτήτου ώρας. Παραδείγματος χάριν, στις 48 ώρες με τις μεθόδους χρώσεων τετραζολίου, η ξανθοχουμόλη για τα καρκινικά κύτταρα

παρουσιάζει IC50 ίσο με 17.6 μ M (95% CI: 14.9, 20.2) σε 28 μελέτες, την ίδια ώρα που στα κανονικά κύτταρα η αντίστοιχη τιμή είναι 53.8 (95% CI: 42, 65.7) σε 10 μελέτες. Η μόνη χημική ένωση που δεν παρουσιάζει την συγκεκριμένη ιδιότητα είναι η λουπουλόνη, στις 48 ώρες, όπου για τα καρκινικά κύτταρα έχει IC50 ίσο με 8.2 μ M (95% CI: 4.7, 11.6) σε 4 μελέτες, ενώ στα υγιή κύτταρα το IC50 φτάνει στα 3.1 μ M (95% CI: 2.1, 4) σε 2 μελέτες.

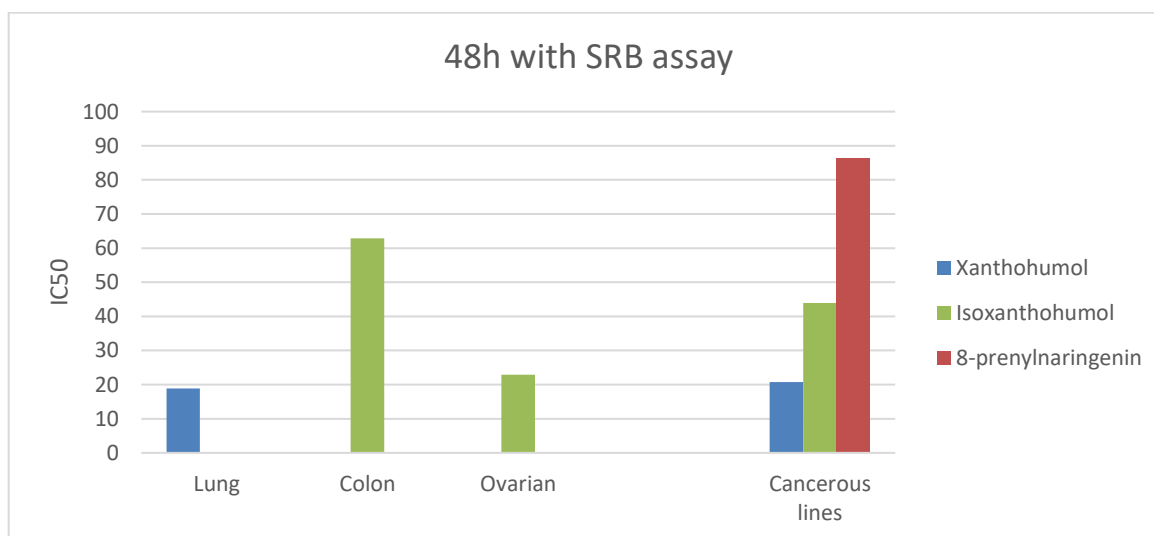
Συγκεντρωτικά, όσον αφορά τις μεθόδους χρώσεων τετραζολίου, η ξανθοχουμόλη παρουσιάζει ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση εν συγκρίσει των υπόλοιπων χημικών ενώσεων και ο χρόνος επώασης είναι ένας ευεργετικός παράγοντας στο τελικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, η ξανθοχουμόλη έχει καλύτερη ανασταλτική δράση στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, σε όλες τις πιθανές ώρες επώασης.

3.3.2. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για την SRB μέθοδο

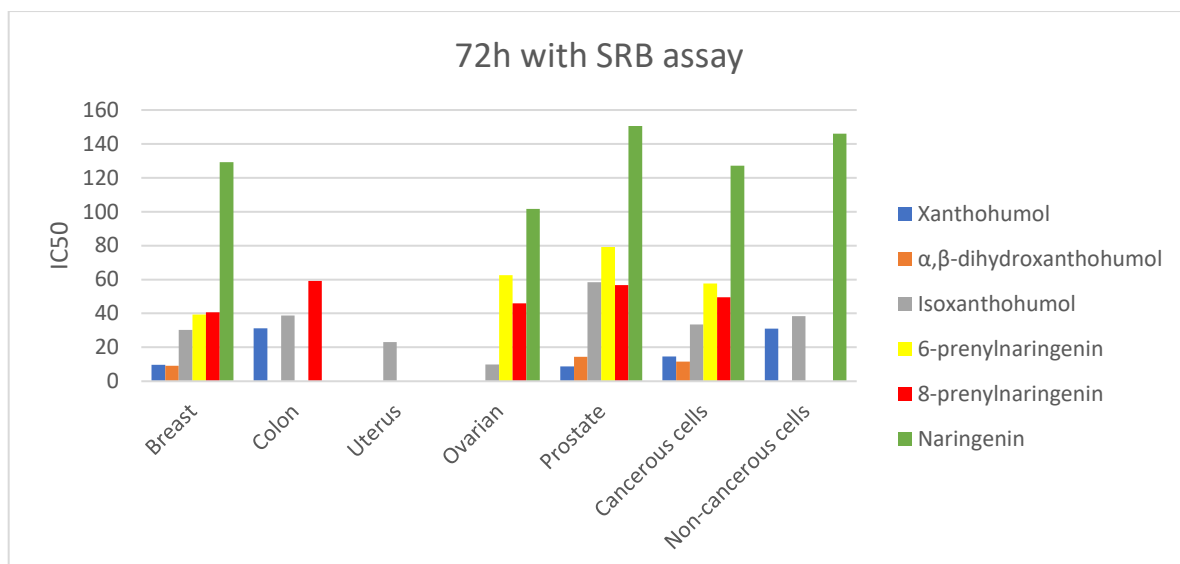
Έπειτα, παρατηρούμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων από την SRB μέθοδο, για τις διάφορες χημικές ενώσεις στους αντίστοιχους τύπους καρκίνου, για τις 24, 48 και 72 ώρες επώασης (εικόνες 23, 24, 25).



Εικόνα 23- Σύγκριση τιμών IC50 που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας την μέθοδο SRB για τις 24 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης για την ξανθοχουμόλη.



Εικόνα 24- Σύγκριση τιμών IC50 που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας την μέθοδο SRB για τις 48 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για την ξανθοχουμόλη, με πράσινο για την ίσο-ξανθοχουμόλη και με κόκκινο για την 8-πρενυλνaringενίνη.



Εικόνα 25- Σύγκριση τιμών IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας την μέθοδο SRB για τις 72 ώρες επώασης. Με διαφορετικά χρώματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τις διάφορες χημικές ενώσεις του λυκίσκου

Όσον αφορά την μέθοδο SRB στις 72 ώρες, στον καρκίνο του μαστού η αντίστοιχη τιμή είναι 9.7 μM (95% CI: 8.6, 10.7) σε 10 μελέτες και στον καρκίνο του προστάτη 8.8 μM (95% CI: 7.2, 10.3) σε 5 μελέτες. Γενικότερα, η ξανθοχουμόλη δείχνει να έχει πιο ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες σε σχέση με τις υπόλοιπες χημικές ενώσεις, καθώς σε όλες τις συγκρίσεις έχει πιο χαμηλές τιμές IC₅₀ σε συνδυασμό με το γεγονός ότι έχουμε περισσότερα πειράματα για την συγκεκριμένη χημική ένωση.

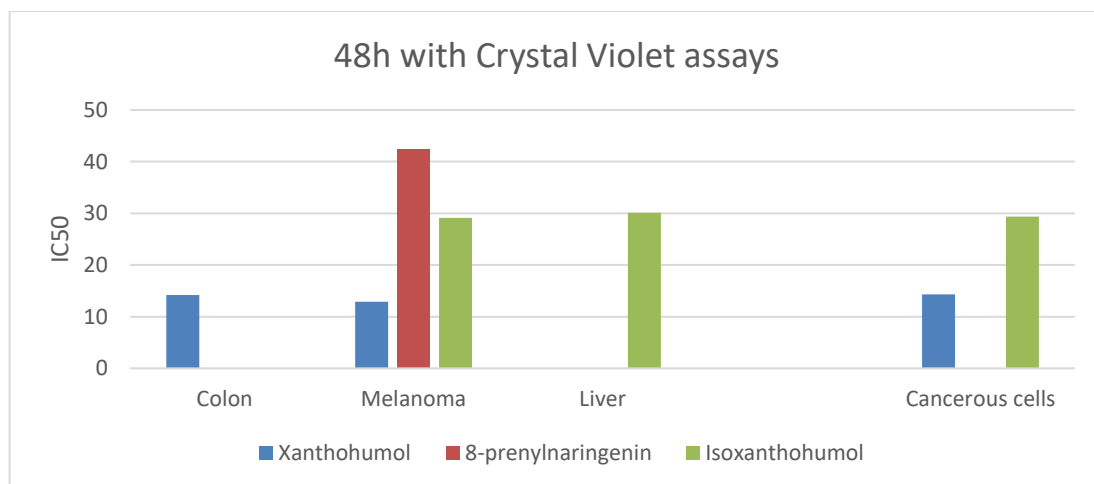
Μια χαρακτηριστική σύγκριση που φαίνεται στην εικόνα 25, όπου για την SRB μέθοδο στις 72 ώρες και για τον ίδιο τύπο καρκίνου (προστάτης) η ξανθοχουμόλη έχει IC₅₀ ίσο με 8.8 μM (95% CI: 7.2, 10.3) σε 5 μελέτες, την ίδια στιγμή η α,β-διϋδροξανθοχουμόλη έχει 14.4 μM (95% CI: 12.1, 16.7) σε 3 μελέτες, η ίσο-ξανθοχουμόλη έχει 58.5 μM (95% CI: 52, 64.9) σε 3 μελέτες, η 8-πρενυλναρινγενίνη έχει 56.8 μM (95% CI: 48, 65.7) σε 2 μελέτες, η 6-πρενυλναρινγενίνη 79.2 μM (95% CI: 71.7, 86.6) σε 2 μελέτες και η ναρινγενίνη έχει 150.6 μM (95% CI: 114, 187.4) σε 2 μελέτες. Συνεπώς, σε αυτό φαίνεται η μεγάλη διαφορά που έχει η ξανθοχουμόλη με τις υπόλοιπες χημικές ενώσεις, όμως η διαφορά δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική με την α,β-διϋδροξανθοχουμόλη. Η τελευταία παρουσιάζει ορισμένα εξίσου ενδιαφέροντα

αποτελέσματα, όπως και στον καρκίνο του μαστού, στις ίδιες συνθήκες, όπου το IC50 φτάνει στα 9.1 μM (95% CI: 8.5, 9.7) σε 4 μελέτες. Όμως, όσον αφορά την συγκεκριμένη χημική ένωση θα χρειαστούμε περαιτέρω έρευνες για να έχει ακόμα μεγαλύτερη ισχύ το τελικό συμπέρασμα. Επομένως, με αυτά τα δεδομένα η ξανθοχουμόλη έχει την πιο ισχυρή δράση, ακολουθούμενη από την α,β -διϋδροξανθοχουμόλη, την 8-πρενυλναρινγενίνη, την ίσο-ξανθοχουμόλη, την 6-πρενυλναρινγενίνη και τέλος την ναρινγενίνη της οποίας η τιμή IC50 ξεπερνάει σε όλους τους τύπους καρκίνου τα 100 μM .

Όπως παρατηρήθηκε στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τις χρώσεις τετραζολίου, έτσι και εδώ η ξανθοχουμόλη παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές IC50 στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Στις 72 ώρες, όπου εκεί έχουμε δεδομένα και για τις δύο αυτές κατηγορίες, οι τιμές IC50 είναι 14.6 μM (95% CI: 12.5, 16.6) σε 26 μελέτες και 31 μM (95% CI: 2.4, 59.6) σε 7 μελέτες για τα καρκινικά και τα υγιή κύτταρα, αντιστοίχως.

3.3.3. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης για την μέθοδο Crystal Violet

Τέλος, παρατηρούμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων για την CV μέθοδο, για τις διάφορες χημικές ενώσεις στους αντίστοιχους τύπους καρκίνου, για τις 48 ώρες επώασης (εικόνα 26), καθώς εντοπίσαμε δεδομένα μόνο για τον συγκεκριμένο χρόνο.



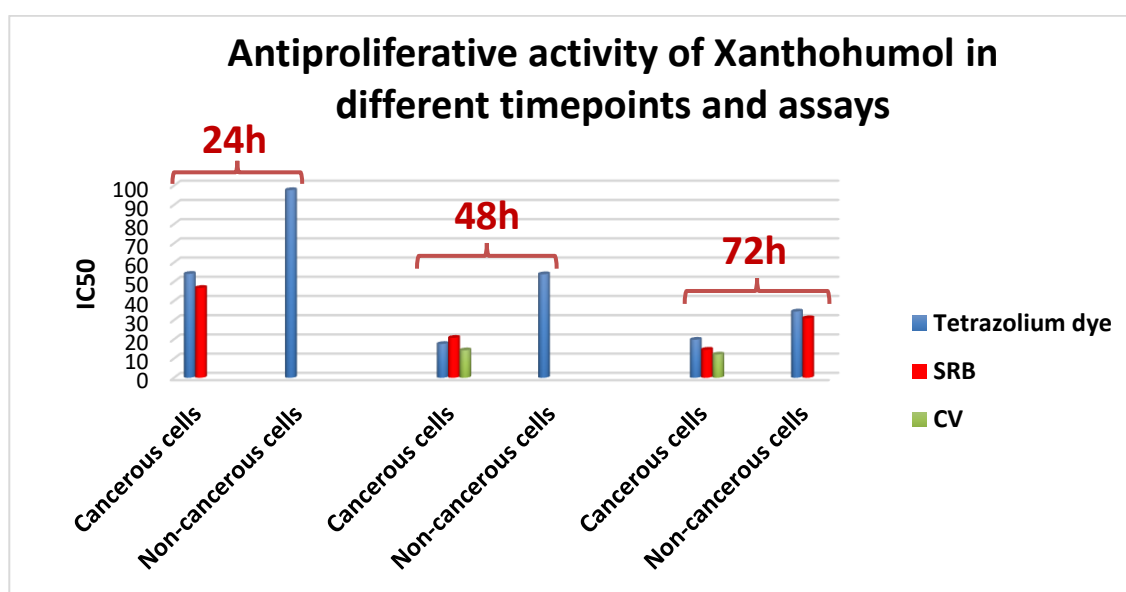
Εικόνα 26- Σύγκριση τιμών IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων για τις διαφορετικές χημικές ενώσεις χρησιμοποιώντας την μέθοδο Crystal Violet για τις 48 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται

Η ξανθοχουμόλη στο μελάνωμα παρουσιάζει IC₅₀ ίσο με 12.9 μ M (95% CI: 7.2, 18.6) σε 2 μελέτες, ενώ η ίσο-ξανθοχουμόλη 29.1 μ M (95% CI: 18.6, 39.6) σε 3 μελέτες και η 8-πρενυλνarinγενίνη 42.4 μ M (95% CI: 33.1, 51.8) σε 2 μελέτες. Συνεπώς, από αυτήν την σύγκριση η ξανθοχουμόλη έχει ισχυρότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση για τα κύτταρα του μελανώματος.

Για την συγκεκριμένη μέθοδο, δεν έχουμε δεδομένα για τις υπόλοιπες ώρες καθώς και για μη καρκινικά κύτταρα, επομένως δεν μπορούμε να εξάγουμε αντίστοιχα συμπεράσματα με τις παραπάνω μεθόδους.

3.4. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση πιθανής ισοδυναμίας μεταξύ των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας

Όπως έχουμε αναφέρει, μέσω της ανάλυσης μετα-παλινδρόμησης έχουμε την δυνατότητα να διερευνήσουμε εάν η στατιστική ετερογένεια προέρχεται από κάποια χαρακτηριστικά των μελετών. Στην εικόνα 25, παρατηρήσαμε ότι οι τρεις αυτές μέθοδοι φαίνεται να μας παρέχουν πανομοιότυπα αποτελέσματα.



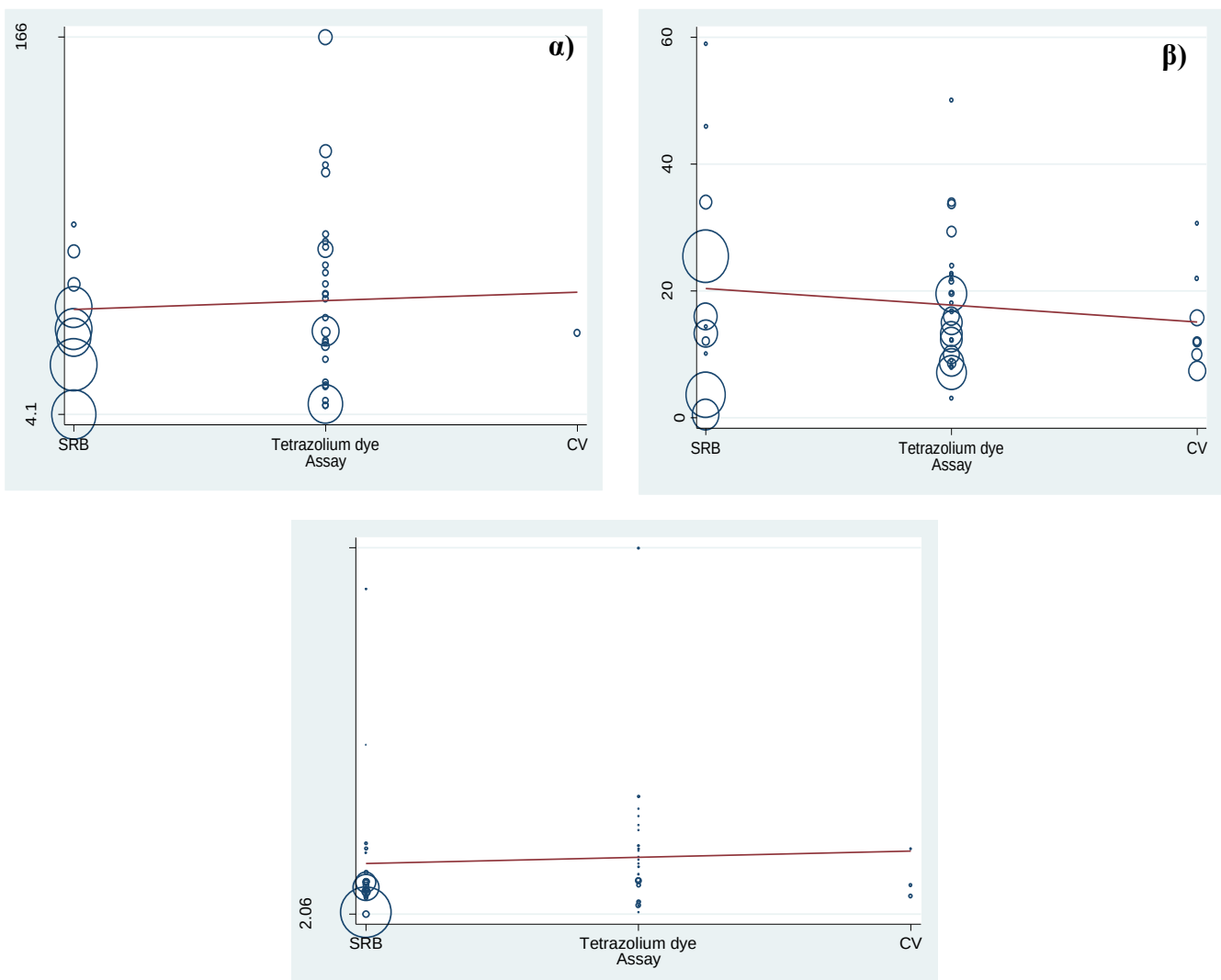
Εικόνα 27- Η ικανότητα της ξανθοχουμόλης να επιδρά πιο αποτελεσματικά στα καρκινικά κύτταρα εν συγκρίσει των κανονικών κυττάρων, ανεξαρτήτου μεθόδου και ώρας. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τις μεθόδους που χρησιμοποιούν τα άλατα τετραζολίου, με κόκκινο τα αποτελέσματα της SRB μεθόδου, ενώ με πράσινο η CV μέθοδος.

Για παράδειγμα, στις 48 ώρες η ξανθοχουμόλη επιφέρει στις καρκινικές σειρές IC₅₀ ίσο με 17.6 μ M (95% CI: 14.9, 20.2) σε 28 μελέτες, 20.7 (95% CI: 13.2, 28.3) σε 11 μελέτες, 14.3 μ M (95% CI: 10.4, 18.3) σε 7 μελέτες, για τις μεθόδους Tetrazolium dye, SRB και CV, αντιστοίχως. Συνεπώς, στόχος μας είναι να διερευνήσουμε εάν αυτές οι διαφορές μεταξύ των μεθόδων είναι στατιστικά σημαντικές.

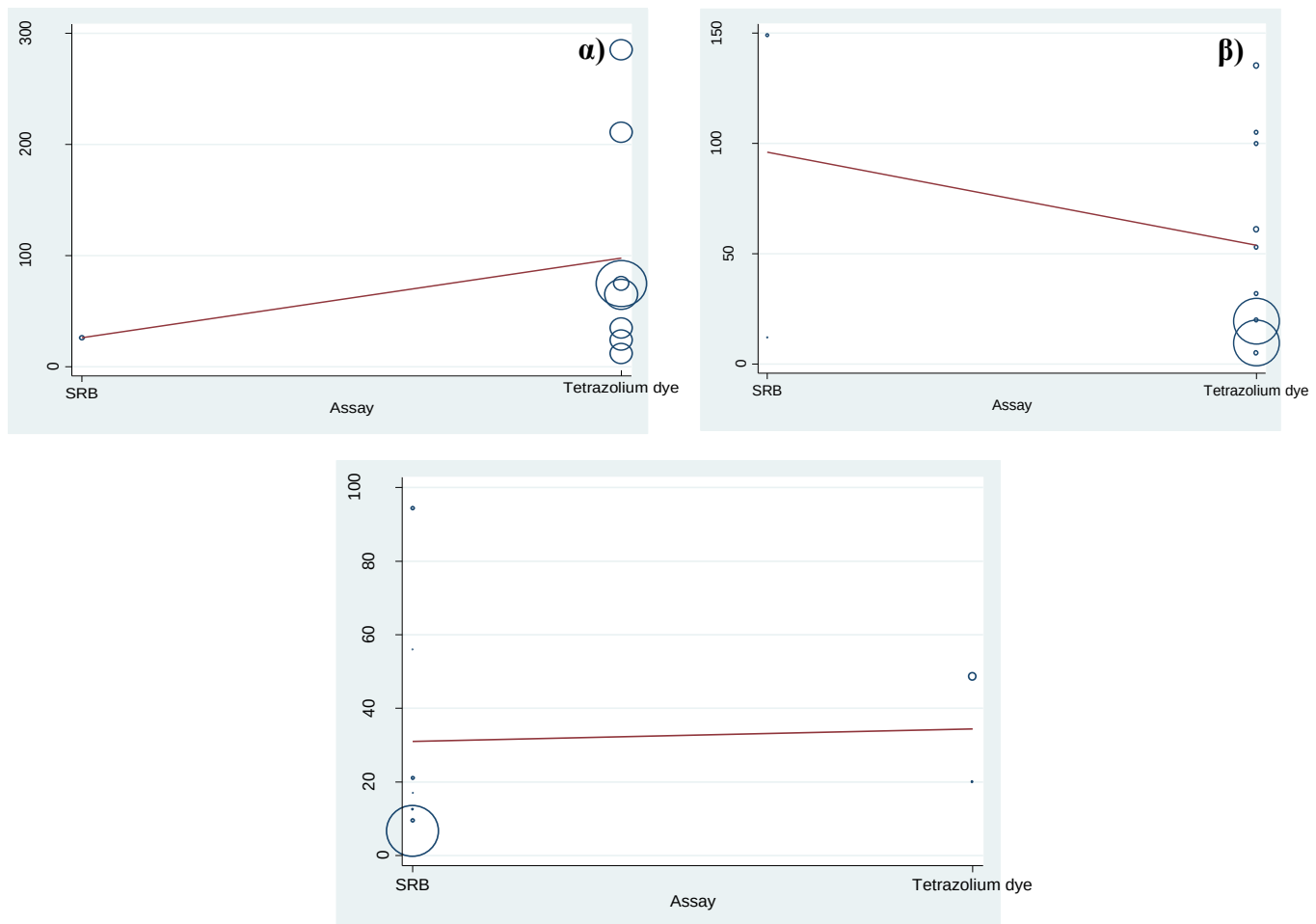
Η εντολή η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι η κάτωθι:


```
metareg ic50 assay_code if compounds=="Xanthohumol" & hours==24, wsse(stde)
mm graph
```

Εξετάζουμε τον τρόπο με τον οποίο αλληλοεπιδρά η εξαρτημένη μεταβλητή (IC50) με την ανεξάρτητη (Μέθοδος) για την ξανθοχουμόλη στις 24 ώρες. Την εντολή την τρέξαμε μόνο για την ξανθοχουμόλη καθώς είναι η μόνη χημική ένωση για την οποία έχουμε άφθονα δεδομένα και στις τρεις αυτές μεθόδους σε διαφορετικές ώρες και επομένως τα αποτελέσματα θα έχουν μεγαλύτερη στατιστική ισχύ.



Εικόνα 28- Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση πιθανής συσχέτισης μεταξύ της τιμής IC50 και των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας (SRB, Tetrazolium dye, CV). Ως δεδομένα εισόδου έχουμε την ξανθοχουμόλη και όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Οι τιμές p-value α) για τις 24 ώρες είναι 0.777, β) για τις 48 ώρες 0.350 και γ) για τις 72 ώρες 0.702.



Εικόνα 29- Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση πιθανής συσχέτισης μεταξύ της τιμής IC_{50} και των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας (SRB, Tetrazolium dye). Ως δεδομένα εισόδου έχουμε την ζανθοχουμόλη και όλες τις μη καρκινικές κυτταρικές σειρές. Δεν εντοπίστηκαν δεδομένα για υγιείς κυτταρικές σειρές για την μέθοδο CV. Οι τιμές p-value α) για τις 24 ώρες είναι 0.517, β) για τις 48 ώρες 0.356 γ) για τις 72 ώρες 0.913.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, οι διαφορές των αποτελεσμάτων των τριών μεθόδων (SRB, Tetrazolium dye, CV), με βάση τις τιμές p-value, είναι στατιστικά μη σημαντικές. Αυτό φαίνεται τόσο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και στις μη καρκινικές και σε οποιοδήποτε χρόνο επώασης των κυττάρων με την χημική ένωση. **Συνεπώς, οι τρεις αυτές μέθοδοι μας παρέχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ισοδύναμα για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας.**

3.5. Εφαρμογή τυποποιημένης διαφοράς μέσων

Εν συνεχεία της προηγούμενης υποενότητας, επιθυμούμε να επαληθεύσουμε την θεωρία των συγκρίσιμων αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Για τον λόγο αυτόν, εφαρμόζουμε την τυποποιημένη διαφορά μέσων. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίζουμε μελέτες όπου οι ερευνητές εφαρμόζουν στην ίδια κυτταρική σειρά δύο ή περισσότερες διαφορετικές μεθόδους για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Υπάρχουν μόνο δύο μελέτες που εκτελούν τις μεθόδους MTT και CV για την ίδια κυτταρική σειρά. Περισσότερες λεπτομέρειες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

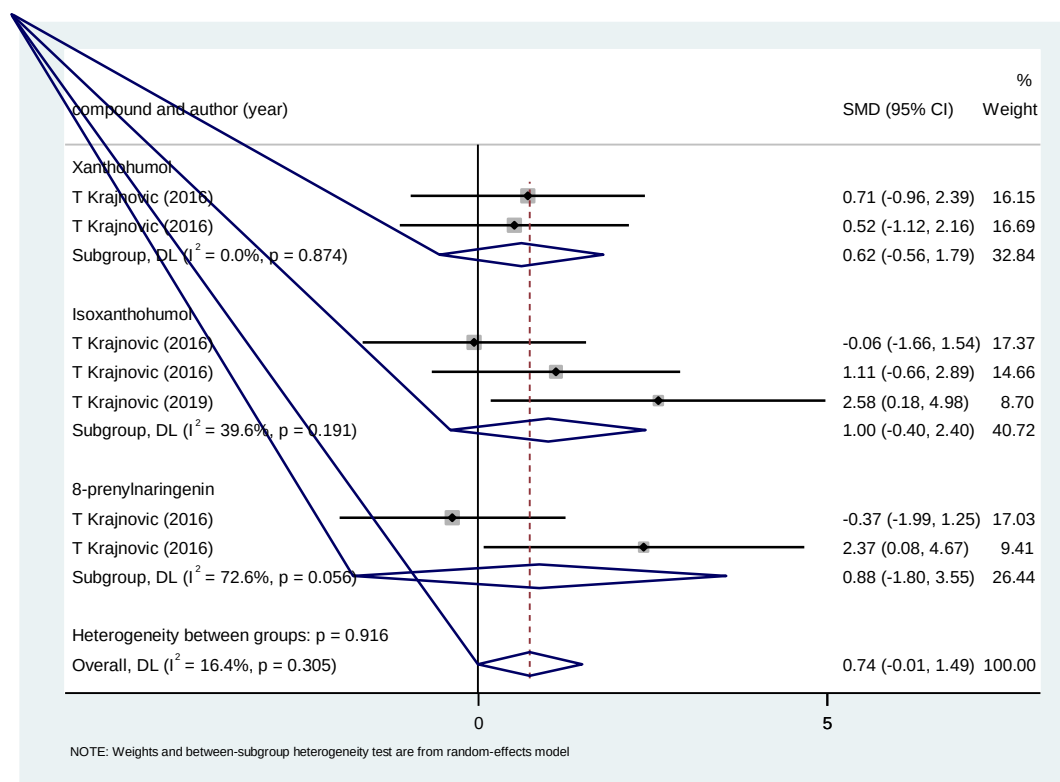
Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά μελετών που θα χρησιμοποιηθούν για την τυποποιημένη μέση διαφορά. Σε αυτά φαίνεται το PMID, η χρονολογία έκδοσης, ο συγγραφέας, το πλήθος των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και η τιμή IC50 με την τυπική απόκλιση για τις μεθόδους MTT και CV αντιστοίχως, η χημική ένωση, η κυτταρική σειρά και ο τύπος καρκίνου.

PMID	YEAR	AUTHOR	Hours	Number of experiments MTT assay	IC50 MTT assay	SD MTT assay	Number of experiments CV assay	IC50 CV assay	SD CV assay	Type of cancer	Cell line	Compound
				n1	v1	sd1	n2	v2	sd2			
26784390	2016	T Krajnović	48	3	8.7	0.99	3	9.97	2.32	Murine melanoma	B16	Xanthohumol
26784390	2016	T Krajnović	48	3	15	1.15	3	15.77	1.74	Human melanoma	A375	Xanthohumol
26784390	2016	T Krajnović	48	3	22.15	4.05	3	21.88	5.19	Murine melanoma	B16	Isoxanthohumol
26784390	2016	T Krajnović	48	3	22.9	0.78	3	24.18	1.43	Human melanoma	A375	Isoxanthohumol
26784390	2016	T Krajnović	48	3	40.85	0.78	3	38.55	8.84	Murine melanoma	B16	8-prenylnaringenin
26784390	2016	T Krajnović	48	3	27.8	3.82	3	48.3	11.6	Human melanoma	A375	8-prenylnaringenin
31034931	2019	T Krajnović	48	3	30	4.05	3	42	5.19	Murine melanoma	B16-F10	Isoxanthohumol

Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση της τυποποιημένης μέσης διαφοράς είναι η παρακάτω:

```
metan n2 v2 sd2 n1 v1 sd1, by(compound) randomi
label(namevar=author,yearvar=year)
```

Ομαδοποιούμε τα αποτελέσματα με βάση τις χημικές ενώσεις. Το διάγραμμα δάσους που λαμβάνουμε φαίνεται στην παρακάτω εικόνα



Εικόνα 30- Τυποποιημένη διαφορά μέσω ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα με βάση τις χημικές ενώσεις. Οι τιμές p-value για την υποομάδα της ξανθοχουμόλης είναι 0.304, για την ίσο-ξανθοχουμόλη 0.162 ενώ για την 8-πρενυλνaringενίνη είναι 0.520.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, εικόνα 30, οι τιμές p-value υποδεικνύουν την στατιστικά μη σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων MTT και CV για καμία υποομάδα των χημικών ενώσεων της ξανθοχουμόλης, ίσο-ξανθοχουμόλης και 8-

πρενυλναρινγενίνης, αντιστοίχως. Συνεπώς, οι μέθοδοι MTT και CV μας παρέχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας

3.6. Συγκεντρωτική μετα-ανάλυση για τον έλεγχο της δράσης της ξανθοχουμόλης ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων (SRB, Tetrazolium dye, CV)

Εφόσον αποδείχθηκε στο προηγούμενο βήμα ότι οι μέθοδοι μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας μας παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα χωρίς να έχουν στατιστικά σημαντικές αποκλείσεις, αποφάνθηκε να επαναληφθεί η διαδικασία της μετα-ανάλυσης για όλες τις μεθόδους μαζί. Με τον τρόπο αυτό θα αυξήσουμε την στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων, καθώς τα αποτελέσματα θα περιλαμβάνουν περισσότερες μελέτες. Η εντολή για την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων η οποία τρέξαμε είναι η παρακάτω:

```
metan ic50 stde if compounds=="Xanthohumol" & hours==24, by(type_of_cancer)
random label(namevar=author, yearvar=year)
```

Τρέξαμε την συγκεκριμένη εντολή για όλες τις πιθανές ώρες και τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης τυχαίων επιδράσεων. Παρουσιάζεται το συνολικό μέγεθος επίδρασης (IC50) μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης και την τιμή p-value, που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση για την ξανθοχουμόλη, στον αντίστοιχο τύπο καρκίνου και χρόνου επώασης των κυττάρων με την συγκεκριμένη χημική ένωση. Τέλος, φαίνεται ο αριθμός των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μετα-ανάλυσης.

Time	Number of studies	Type of cancer	IC50	95% CI		p-value
				lower bound	upper bound	
24	5/	Colon	33.830	11.555	56.105	0.003
24	6/	Liver	88.078	52.804	123.352	0.000
24	2/	Neck	50.800	40.608	60.992	0.000
24	7/	Breast	48.974	29.381	68.567	0.000
24	5/	Glioblastoma	60.440	55.131	65.749	0.000
24	4/	Gastric	42.752	-3.383	88.888	0.069
24	2/	Pancreas	18.850	1.504	36.196	0.033
24	9/	No cancer	90.025	35.938	144.112	0.001
24	37/	Cancerous lines	52.162	42.663	61.661	0.000
48	7/	Breast	21.746	13.255	30.237	0.000
48	3/	Lung	15.495	3.176	27.814	0.014
48	2/	Cervix	21.271	-4.309	46.851	0.103
48	6/	Colon	17.018	8.621	25.414	0.000
48	5/	Melanoma	12.543	8.890	16.197	0.000
48	2/	Ovarian	8.257	-6.913	23.427	0.286
48	3/	Liver	10.995	6.676	15.314	0.000
48	4/	Neck	18.925	14.112	23.738	0.000
48	3/	Leukemia	15.219	9.545	20.893	0.000
48	2/	Myeloma	35.985	8.281	63.689	0.011
48	3/	Prostate	13.862	11.355	16.369	0.000
48	2/	Pancreas	8.600	2.759	14.441	0.004
48	12/	No cancer	59.526	47.780	71.272	0.000
48	46/	Cancerous lines	17.959	15.187	20.732	0.000
72	13/	Breast	11.597	10.104	13.090	0.000
72	4/	Liver	39.792	-3.433	83.017	0.071
72	2/	Lung	17.018	9.822	24.214	0.000
72	8/	Colon	23.453	19.480	27.427	0.000
72	2/	Ovarian	5.141	-0.886	11.168	0.095
72	9/	Prostate	13.028	10.610	15.445	0.000
72	5/	Pancreas	11.863	7.163	16.563	0.000
72	2/	Neck	18.650	12.809	24.491	0.000
72	3/	Leukemia	6.587	3.263	9.911	0.000
72	9/	No cancer	31.801	10.311	53.291	0.004

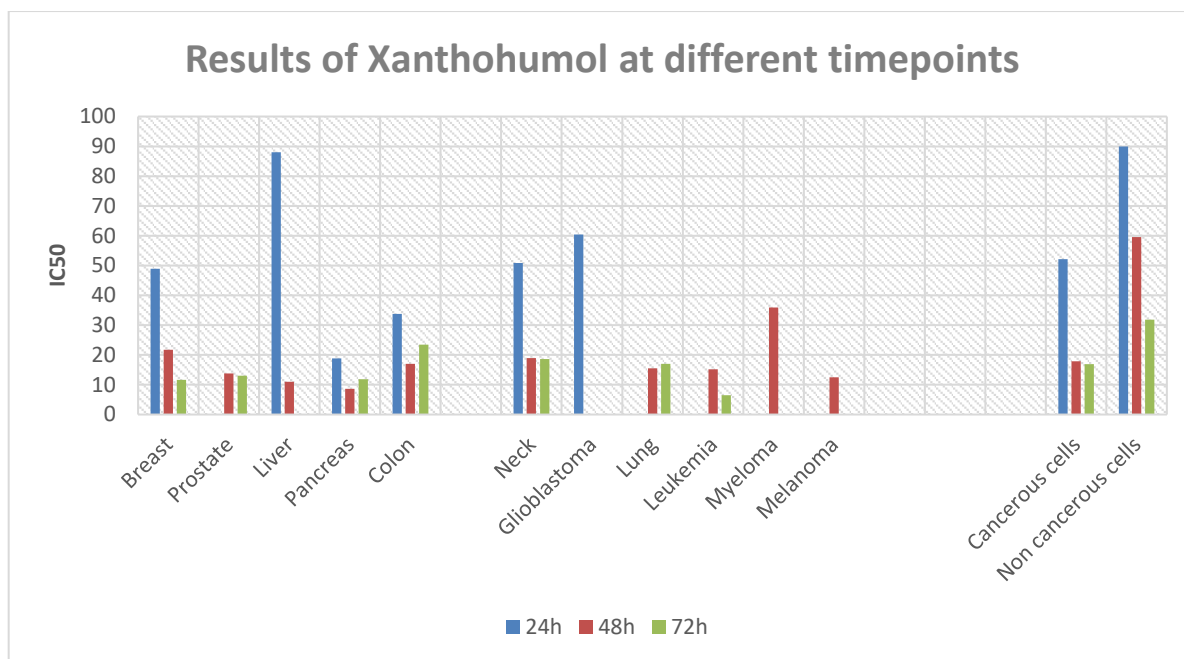
72	52/	Cancerous lines	16.892	15.182	18.602	0.000
----	-----	-----------------	--------	--------	--------	-------

Στον πίνακα παρακάτω προστέθηκαν επιπλέον και τα αποτελέσματα της ξανθοχουμόλης για τις μεθόδους (SRB, Tetrazolium dye, CV) όπως επίσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση τους.

Πίνακας 13. Σύγκριση τιμών IC50 μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων (Tetrazolium dye, SRB, CV) αλλά και της μεταξύ τους ομαδοποίησης, για την ξανθοχουμόλη στις 3 διαφορετικές ώρες επώασης (24, 48, 72) για τα καρκινικά και μη καρκινικά κύτταρα.

	Tetrazolium dye	SRB	CV	All assays
24h				
Cancerous cells	54.1	46.8		52.1
Non-cancerous cells	97.7			90
48h				
Cancerous cells	17.6	20.8	14.3	17.9
Non-cancerous cells	53.9			59.5
72h				
Cancerous cells	19.8	14.6	12.1	16.9
Non-cancerous cells	34.5	31		31.8

Όπως παρατηρούμε οι τιμές IC50, ανάμεσα στις διαφορετικές μεθόδους, δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά. Για παράδειγμα, στις 48 ώρες για τα καρκινικά κύτταρα η τιμή IC50 για τις μεθόδους Tetrazolium dye είναι 17.6 μ M, για την SRB 20.8 μ M και για την CV 14.3 μ M, ενώ αν τις ομαδοποιήσουμε το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης είναι 17.9 μ M. Βέβαια, αποδείξαμε στην προηγούμενη υποενότητα ότι οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά μη σημαντικές. Για τον εποπτικό έλεγχο της δράσης της ξανθοχουμόλης στους διάφορους τύπους καρκίνου για τις 24, 48 και 72 ώρες, δημιουργήθηκε το παρακάτω γράφημα με τις αντίστοιχες τιμές IC50 (εικόνα 31). Παρουσιάζονται επιπλέον και τα διαγράμματα δάσους που προέκυψαν από τις αντίστοιχες μετα-αναλύσεις για τις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα.



Εικόνα 31- Σύγκριση τιμών IC₅₀ της ξανθοχουμόλης για τους διάφορους τύπους καρκίνου που προκύπτουν από την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων στους διαφορετικούς χρόνους επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τις 24 ώρες, με κόκκινο για τις 48 ώρες και με πράσινο για τις 72 ώρες.

Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου που εντοπίστηκαν και άρα στην μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έχουν πιο σημαντική αντιπροσώπευση είναι οι καρκίνοι του μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου. Μερικά αποτελέσματα τα οποία είναι άξια αναφοράς αφορούν τον καρκίνο του μαστού, όπου το IC₅₀ στις 72 ώρες είναι 11.6 μ M (95% CI: 10.1, 13.1) σε 13 μελέτες, ενώ για τον καρκίνο του προστάτη είναι 13 μ M (95% CI: 10.6, 15.4) σε 9 μελέτες. Επιπλέον, στον καρκίνο του ήπατος για τις 24 ώρες φαίνεται να μην έχει τόσο αποτελεσματική δράση καθώς το IC₅₀ είναι ίσο με 88 μ M (95% CI: 52.8, 123.3) σε 6 μελέτες. Όμως, για τις 48 ώρες το αποτέλεσμα είναι αρκετά καλύτερο, καθώς το IC₅₀ μειώνεται στα 10.9 μ M (95% CI: 6.6, 15.3) σε 3 μελέτες. Επιπλέον, μπορούμε να παρατηρήσουμε τις εμφανείς διαφορές όσον αφορά τις τιμές μεταξύ των καρκινικών και των κανονικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στις 24, 48 και 72 ώρες οι τιμές IC₅₀ για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι 52.1 μ M (95% CI: 42.6, 61.6) σε 37 μελέτες, 17.9 μ M (95% CI: 15.1, 20.7) σε 46 μελέτες και 16.8 μ M (95% CI: 15.1, 18.6) σε 52 μελέτες, αντιστοίχως. Την ίδια στιγμή που για τις κανονικές κυτταρικές σειρές οι αντίστοιχες τιμές είναι 90 μ M (95% CI: 35.9, 144.1) σε 9 μελέτες, 59.5 μ M (95% CI: 47.7, 71.2) σε 12 μελέτες και 31.8 μ M (95%

CI: 10.3, 53.2) σε 9 μελέτες. **Συνεπώς, παρατηρούμε ότι η ξανθοχουμόλη είναι πιο επιδραστική στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή, σε όλες τις ώρες.**

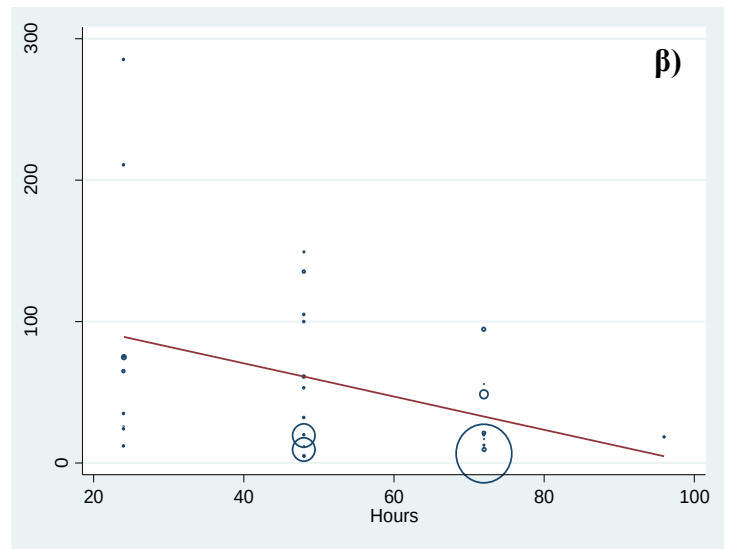
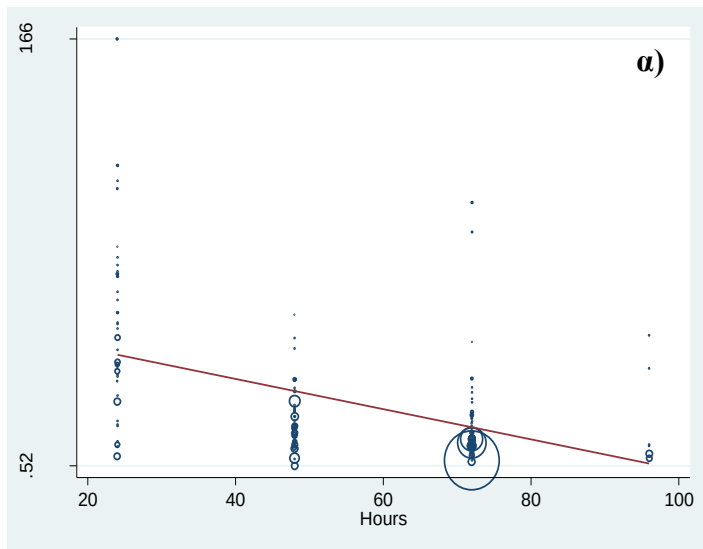
3.7. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση συσχέτισης αντιπολλαπλασιαστικής δράσης με τον χρόνο επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση

Ένας ακόμη παράγοντας που παρατηρήσαμε ότι μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο τελικό αποτέλεσμα είναι ο χρόνος που επωάζονται τα κύτταρα με τις χημικές ενώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αποτέλεσμα των μετα-αναλύσεων για την ξανθοχουμόλη για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές με την χρήση της SRB μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, στις 24 ώρες η τιμή για το IC50 είναι 46.8 μ M (95% CI: 33.1, 60.4) σε 8 μελέτες, στις 48 ώρες 20.8 μ M (95% CI: 13.2, 28.3) σε 11 μελέτες ενώ στις 72 ώρες το IC50 βρέθηκε να είναι 14.6 μ M (95% CI: 12.5, 16.6) σε 26 μελέτες. Συνεπώς, θα πρέπει να διερευνηθεί κατά πόσο οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ωρών είναι στατιστικά σημαντικές. Για την συγκεκριμένη ανάλυση θα εξεταστούν όλες οι μέθοδοι μαζί, καθώς αποδείχθηκε στην προηγούμενη ενότητα ότι τα αποτελέσματά τους είναι συγκρίσιμα. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι η παρακάτω:

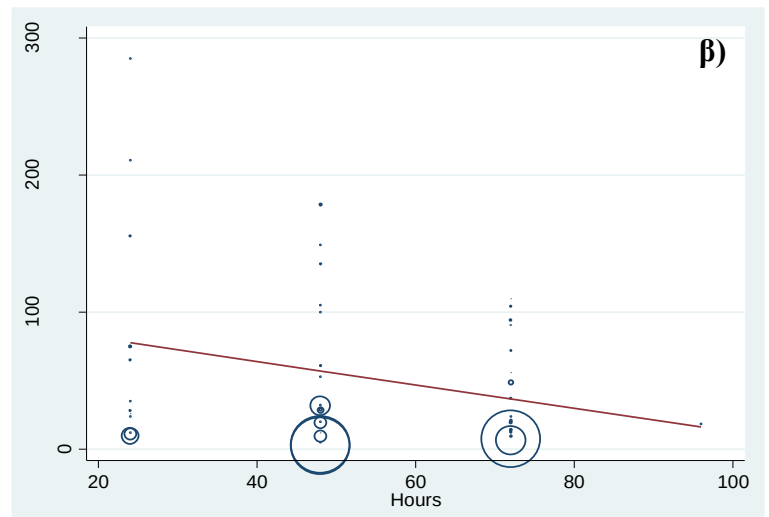
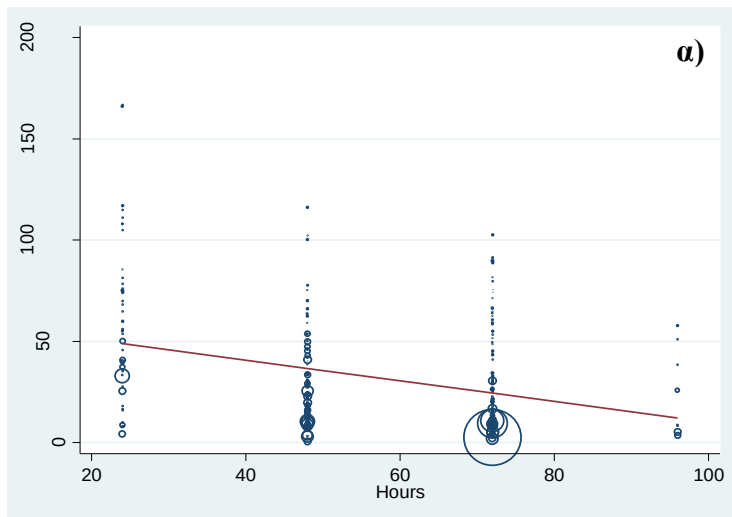
```
metareg ic50 hours if compounds=="Xanthohumol" & type_of_cancer!="No cancer",  
wsse(stde) mm graph
```

Όπου η συγκεκριμένη εντολή εξετάζει τον τρόπο με τον οποίο αλληλοεπιδρά η εξαρτώμενη μεταβλητή (IC50) με την ανεξάρτητη (ώρες). Περιορίζουμε την επιλογή

των δεδομένων μόνο στην ξανθοχουμόλη και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Στην περίπτωση που επιθυμούμε να επιλέξουμε τις μη καρκινικές σειρές αλλάζουμε την δεύτερη λογική συνθήκη σε `type_of_cancer=="No cancer"`.



Εικόνα 32- Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση της συσχέτισης μεταξύ των τιμών IC50 και του χρόνου επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν την ξανθοχουμόλη, α) για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές όπου το p-value είναι ίσο με 0.000 και β) τις μη καρκινικές όπου το p-value είναι 0.040.



Εικόνα 33-Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την εύρεση της συσχέτισης μεταξύ των τιμών IC50 και του χρόνου επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν όλες τις χημικές ενώσεις μαζί α) για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές με τιμή p-value ίση με 0.000 και β) τις μη καρκινικές με p-value 0.038.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ξανθοχουμόλης επηρεάζεται από τον χρόνο που επωάζεται με τα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, **όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επώασης τόσο πιο χαμηλές τιμές IC50 παρατηρούνται και επομένως η αντιπολλαπλασιαστική ιδιότητα της ξανθοχουμόλης ενισχύεται**. Η συγκεκριμένη δράση δείχνει να επαληθεύεται τόσο στις καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και στις μη καρκινικές, εικόνα 32, καθώς η τιμές p-value υποδεικνύουν την στατιστικά μη σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ωρών. Επιπλέον, εισήχθησαν στην ανάλυση και οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις, εικόνα 33, διότι εάν εισαχθούν μεμονωμένα δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σε όλο το εύρος των ωρών. Και σε αυτή την περίπτωση οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά μη σημαντικές τόσο στις καρκινικές όσο και στις μη καρκινικές κυτταρικές σειρές.

3.8. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των χημικών ενώσεων ανάμεσα στις καρκινικές και μη κυτταρικές σειρές

Όπως αναφέραμε, η ικανότητα ενός υποψήφιου χημειοθεραπευτικού παράγοντα να μπορεί να είναι πιο επιδραστικός στα καρκινικά κύτταρα απ' ότι στα υγιή, είναι μια εξαιρετικά σημαντική ιδιότητα. Παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης η ξανθοχουμόλη παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές IC50 στα καρκινικά κύτταρα σε όλες τις μεθόδους και σε οποιαδήποτε ώρα. Αυτό το χαρακτηριστικό διερευνούμε περαιτέρω σε αυτήν την υποενότητα, όπου εξετάζουμε την κάθε χημική ένωση για όλες τις μεθόδους μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας μαζί για κάθε μια ξεχωριστή ώρα. Η εντολή που χρησιμοποιήθηκε είναι η εξής:

```
metareg ic50 cancer_or_non if compounds=="Xanthohumol" & hours==24,  
wsse(stde) mm graph
```

Δοκιμάζουμε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ των χημικών ενώσεων και των ωρών, για τους οποίους πρέπει να έχουμε δεδομένα τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα υγιή. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 13. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των χημικών ενώσεων μεταξύ καρκινικών και υγιών κυττάρων για κάθε ώρα επώασης. Επιπλέον, φαίνεται η τιμή coefficient και η τιμή p-value.

<i>Compound</i>	<i>Hours</i>	<i>Coefficient</i>	<i>p-value</i>
Xanthohumol	24	-38.8	0.049
Xanthohumol	48	-41.7	0.000
Xanthohumol	72	-14.5	0.088
α,β-dihydroxanthohumol	72	-27.8	0.046
Lupulone	72	5.1	0.129
8-prenylnaringenin	72	-5.5	0.777
6-prenylnaringenin	72	1.7	0.947
Isoxanthohumol	72	-4.4	0.760

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε οι διαφορές στις τιμές των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τις μη καρκινικές, είναι στατιστικά σημαντικές στην ξανθοχουμόλη στις 24 και 48 ώρες και στην α,β-διϋδροξανθοχουμόλη στις 48 ώρες. Σε οποιαδήποτε άλλη συνθήκη οι διαφορές είναι στατιστικά μη σημαντικές.

3.9. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης κατηγοριοποιώντας τις χημικές ενώσεις σε φλαβονοειδή και πικρά οξέα

Όπως αναφέραμε οι τρεις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στους θηλυκούς κώνους είναι οι πολυφαινόλες, τα πικρά οξέα και τα συστατικά των αιθέριων ελαίων. Στις πολυφαινόλες θα εξετάσουμε την πιο ποικιλόμορφη και

διαδεδομένη κατηγορία, τα φλαβονοειδή. Επειδή δεν εντοπίστηκαν δεδομένα για χημικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των αιθέριων ελαίων, η σύγκριση γίνεται μεταξύ πικρών οξέων και φλαβονοειδών. Όσον αφορά την τελευταία ομάδα, περιέχει τις ακόλουθες χημικές ενώσεις: ξανθοχουμόλη, δεσμέθυλοξανθοχουμόλη και η α,β-διϋδροξανθοχουμόλη, ίσο-ξανθοχουμόλη, η 8-πρενυλναρινγενίνη και η 6-πρενυλναρινγενίνη. Από την άλλη, στα πικρά οξέα θα συμπεριληφθούν η λουπουλόνη, η χουμουλόνη και όλες οι κατηγορίες των α-οξέων. Εφόσον, αποδείχθηκε ότι όλες οι μέθοδοι που ποσοτικοποιούν την κυτταρική βιωσιμότητα παρουσιάζουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, τότε θα ομαδοποιήσουμε όλες τις μεθόδους μαζί. Η εντολή που τρέχουμε στο στατιστικό πακέτο Stata για τα φλαβονοειδή είναι η παρακάτω:

```
metan ic50 stde if (compounds=="Xanthohumol" & hours==24) |
(compounds=="Isoxanthohumol" & hours==24) | (compounds=="6-prenylnaringenin"
& hours==24) | (compounds=="8-prenylnaringenin" & hours==24) |
(compounds=="α,β-dihydroxanthohumol" & hours==24) |
(compounds=="Desmethyloxanthohumol" & hours==24) , by(type_of_cancer) random
label(namevar=author, yearvar=year)
```

Ενώ, αντίστοιχα η εντολή για τα πικρά οξέα είναι η παρακάτω:

```
metan ic50 stde if (compounds=="Tetrahydro Iso-Alpha Acids" & hours==48) |
(compounds=="α-acids" & hours==48) | (compounds=="Iso-α-acids" & hours==48) |
(compounds=="Dihydro-iso-alpha acids" & hours==48) | (compounds=="Lupulone"
& hours==48) | (compounds=="Humulone" & hours==48) , by(type_of_cancer)
random label(namevar=author, yearvar=year)
```

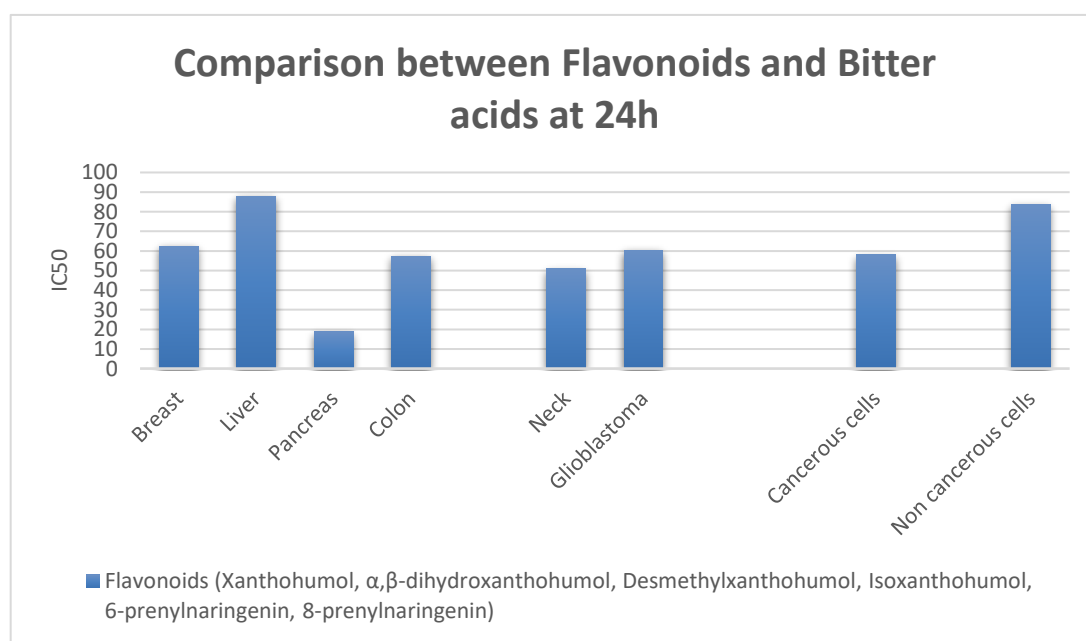
Αφού εφαρμόσουμε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς όσον αφορά τον χρόνο επώασης, λαμβάνουμε τα κάτωθι αποτελέσματα.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης τυχαίων επιδράσεων. Παρουσιάζεται το συνολικό μέγεθος επίδρασης (IC50) μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης και την τιμή p-value, που προέκυψαν από την αντίστοιχη μετα-ανάλυση για μια συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων, τύπο καρκίνου και χρόνου επώασης. Τέλος, φαίνεται ο αριθμός των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μετα-ανάλυσης.

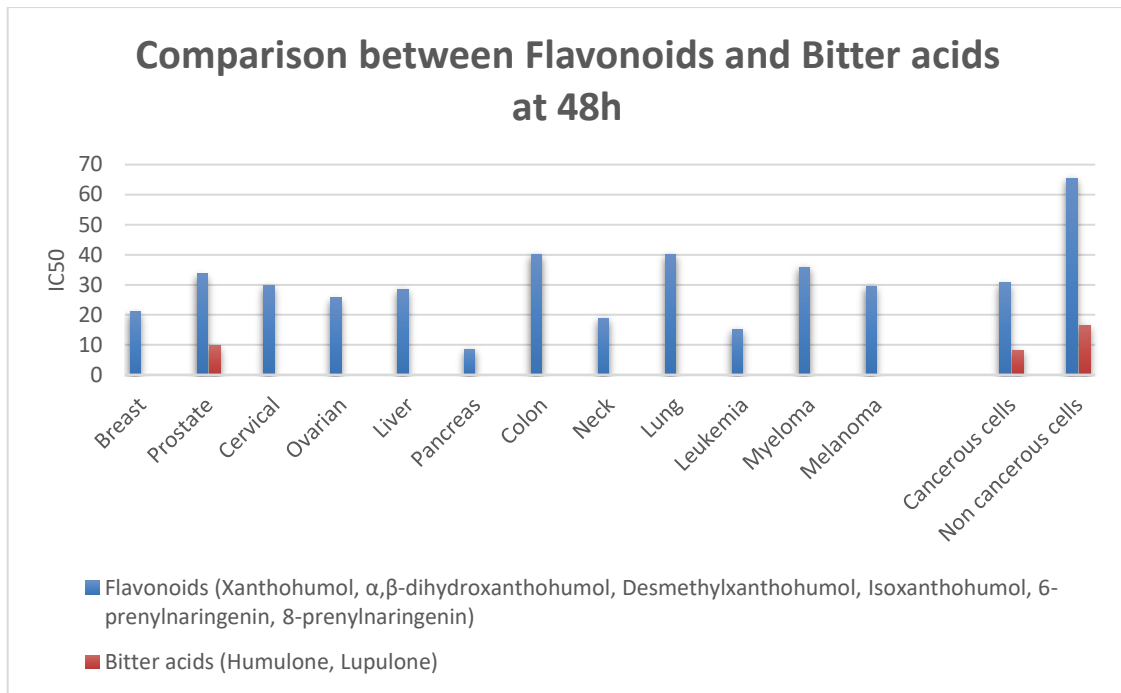
Compound	Time	Number of studies	Type of cancer	IC50	95% CI		p-value
					lower bound	upper bound	
Flavonoids	24	8/	Colon	57.299	37.957	76.642	0.000
Flavonoids	24	6/	Liver	88.078	52.804	123.352	0.000
Flavonoids	24	2/	Neck	50.800	40.608	60.992	0.000
Flavonoids	24	9/	Breast	62.501	39.984	85.018	0.000
Flavonoids	24	5/	Glioblastoma	60.440	55.131	65.749	0.000
Flavonoids	24	4/	Gastric	42.752	-3.383	88.888	0.069
Flavonoids	24	2/	Pancreas	18.850	1.504	36.196	0.033
Flavonoids	24	10/	No cancer	83.818	35.292	132.344	0.001
Flavonoids	24	42/	Cancerous lines	58.081	48.865	67.296	0.000
Flavonoids	48	10/	Colon	40.229	16.026	64.431	0.001
Flavonoids	48	6/	Liver	28.552	13.657	43.448	0.000
Flavonoids	48	17/	Melanoma	29.610	23.127	36.093	0.000
Flavonoids	48	8/	Breast	21.092	13.156	29.027	0.000
Flavonoids	48	6/	Lung	40.199	23.534	56.865	0.000
Flavonoids	48	3/	Cervix	29.934	15.094	44.774	0.000
Flavonoids	48	5/	Ovarian	25.743	14.659	36.827	0.000
Flavonoids	48	2/	Bone	72.792	-12.270	157.855	0.093
Flavonoids	48	4/	Neck	18.925	14.112	23.738	0.000
Flavonoids	48	3/	Leukemia	15.219	9.545	20.893	0.000
Flavonoids	48	2/	Myeloma	35.985	8.281	63.689	0.011
Flavonoids	48	11/	Prostate	33.673	24.472	42.873	0.000
Flavonoids	48	2/	Pancreas	8.600	2.759	14.441	0.004
Flavonoids	48	14/	No cancer	65.534	48.748	82.319	0.000
Flavonoids	48	82/	Cancerous lines	30.816	27.090	34.543	0.000
Flavonoids	72	19/	Colon	38.499	33.994	43.005	0.000
Flavonoids	72	30/	Breast	18.975	17.134	20.817	0.000
Flavonoids	72	4/	Liver	39.792	-3.433	83.017	0.071
Flavonoids	72	3/	Lung	21.120	12.276	29.964	0.000
Flavonoids	72	10/	Ovarian	18.741	14.697	22.784	0.000
Flavonoids	72	19/	Prostate	30.905	26.038	35.773	0.000
Flavonoids	72	2/	Uterus	23.155	9.044	37.267	0.001
Flavonoids	72	5/	Pancreas	11.863	7.163	16.563	0.000
Flavonoids	72	2/	Neck	18.650	12.809	24.491	0.000
Flavonoids	72	3/	Leukemia	6.587	3.263	9.911	0.000
Flavonoids	72	2/	Glioblastoma	15.012	11.004	19.019	0.000
Flavonoids	72	18/	No cancer	39.694	25.849	53.539	0.000
Flavonoids	72	102/	Cancerous lines	25.402	23.724	27.081	0.000
Bitter acids	48	2/	Prostate	9.750	8.280	11.220	0.000
Bitter acids	48	4/	No cancer	16.653	8.109	25.198	0.000
Bitter acids	48	4/	Cancerous	8.201	4.773	11.630	0.000

			lines				
Bitter acids	72	7/	Breast	16.057	10.238	21.876	0.000
Bitter acids	72	2/	Prostate	5.000	4.600	5.400	0.000
Bitter acids	72	9/	Cancerous lines	8.722	6.525	10.919	0.000

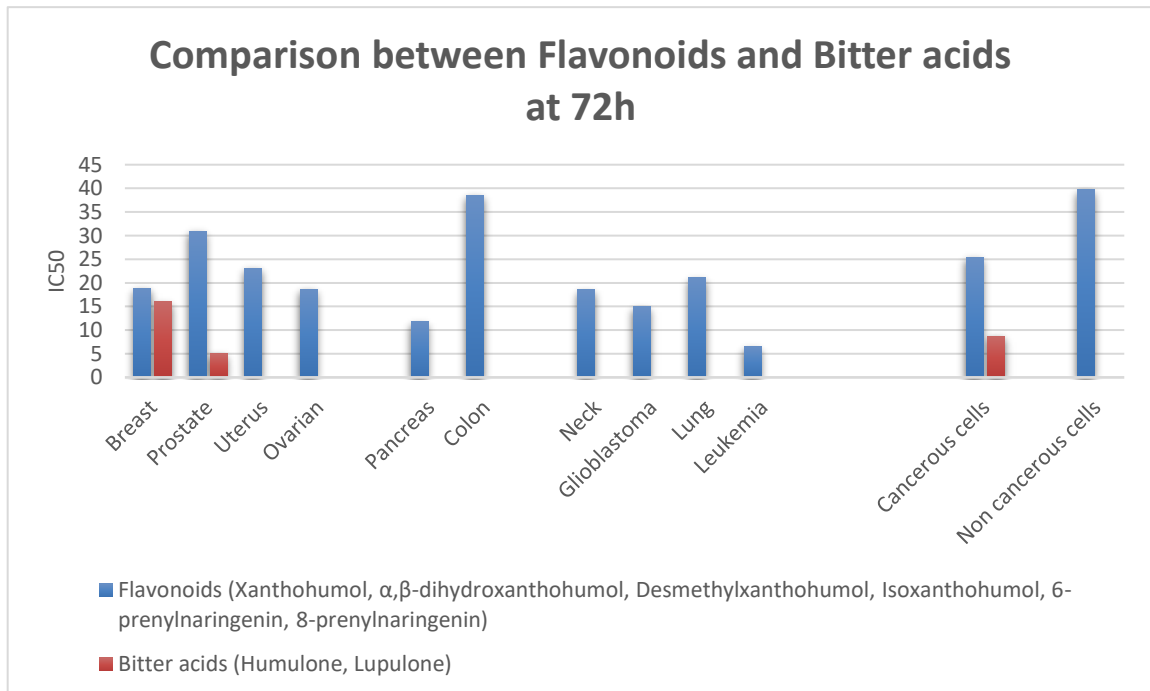
Για τον εποπτικό έλεγχο της δράσης της κάθε ομάδας χημικών ενώσεων στους διαφόρους τύπους καρκίνου και για κάθε ένα από τα χρονικά διαστήματα 24, 48, 72 ώρες δημιουργήθηκαν γραφήματα με τις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση (εικόνες 34, 35, 36).



Εικόνα 34- Σύγκριση τιμών IC₅₀ για τα φλαβονοειδή και τα πικρά οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 24 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τα φλαβονοειδή.



Εικόνα 35- Σύγκριση τιμών IC₅₀ για τα φλαβονοειδή και τα πικρά οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 48 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τα φλαβονοειδή, ενώ με κόκκινο για τα πικρά οξέα.



Εικόνα 36- Σύγκριση τιμών IC₅₀ για τα φλαβονοειδή και τα πικρά οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 72 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης για τα φλαβονοειδή, ενώ με κόκκινο για τα πικρά οξέα.

Σε όλες τις διαφορετικές ώρες, τα πικρά οξέα φαίνεται να παρουσιάζουν καλύτερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή. Όμως, ο αριθμός των μελετών που έχουμε στην διάθεση μας για τα πικρά οξέα είναι ιδιαίτερα περιορισμένος. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα στις 48 ώρες όπου για τον καρκίνο του προστάτη, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ένα IC₅₀ ίσο με 33.3 μM (95% CI: 24.4, 42.8) σε 11 μελέτες, ενώ για τα πικρά οξέα είναι 9.7 μM (95% CI: 8.2, 11.2) σε 2 μελέτες. Επιπλέον, στις 72 ώρες για το σύνολο των καρκινικών κυττάρων το IC₅₀ για τα φλαβονοειδή είναι 25.4 μM (95% CI: 23.7, 27.1) σε 102 πειράματα, την ίδια ώρα που για τα πικρά οξέα είναι 8.7 μM (95% CI: 6.5, 10.9) σε 9 πειράματα. Επομένως, δεν είμαστε σε θέση να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά τις καλύτερες επιδόσεις των πικρών οξέων εν συγκρίσει των φλαβονοειδών, καθώς η στατιστική τους ισχύ είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα φλαβονοειδή μπορούμε να παρατηρήσουμε την διαφορά που έχει στην ανασταλτική επίδραση μεταξύ καρκινικών και κανονικών κυττάρων, σε όλες τις ώρες. Πιο συγκεκριμένα, στις 24 ώρες το IC₅₀ για τα καρκινικά κύτταρα είναι 58.1 μM (95% CI: 48.8, 67.2) σε 42 μελέτες, ενώ για τα μη καρκινικά είναι 83.8 μM (95% CI: 35.2, 132.3) σε 10 μελέτες. Παρομοίως, στις 48 ώρες για τα καρκινικά κύτταρα είναι 30.8 μM (95% CI: 27.1, 34.5) σε 82 πειράματα, ενώ για τα κανονικά κύτταρα είναι 65.5 μM (95% CI: 48.7, 82.3) σε 14 πειράματα. Στις 72 ώρες το IC₅₀ για τα καρκινικά κύτταρα είναι 25.4 μM (95% CI: 23.7, 27.1) σε 102 πειράματα, ενώ για τα υγιή κύτταρα είναι 39.7 μM (95% CI: 25.8, 53.5) σε 18 πειράματα. Τέλος, δυνάμεθα να παρατηρήσουμε και την μείωση που έχει η τιμή του δείκτη IC₅₀ με την πάροδο του χρόνου. Δηλαδή, για τον καρκίνο του μαστού οι τιμές είναι 62.5 μM (95% CI: 39.9, 85) σε 9 μελέτες, 21.1 μM (95% CI: 13.1, 29) σε 8 μελέτες, 18.9 μM (95% CI: 17.1, 20.8) σε 30 μελέτες, για τις 24, 48 και 72 ώρες, αντίστοιχα.

3.10. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης κατηγοριοποιώντας τις χημικές ενώσεις σε χαλκόνες- φλαβόνες- α-β- οξέα

Επόμενο βήμα είναι να επαναλάβουμε την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων, όμως αυτήν την φορά πραγματοποιήσαμε μια ομαδοποίηση των χημικών ενώσεων ως προς την ομάδα των φλαβονοειδών ή πικρών οξέων στην οποία ανήκουν. Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία των χαλκονών εισαγάγαμε τις: ξανθοχουμόλη, δεσμέθυλοξανθοχουμόλη και α,β-διϋδροξανθοχουμόλη. Στην ομάδα των φλαβονών ανήκουν η ίσο-ξανθοχουμόλη, η 8-πρενυλναρινγενίνη και η 6-πρενυλναρινγενίνη. Όσον αφορά τα πικρά οξέα, στα β-οξέα ανήκει η λουπουλόνη, ενώ στα α-οξέα η χουμουλόνη. Για την μετα-ανάλυση τυχαίων επιδράσεων με την κατηγορία των χαλκονών η εντολή που χρησιμοποιούμε είναι η εξής:

```
metan ic50 stde if (compounds=="Xanthohumol" & hours==24) | (compounds=="α,β-  
dihydroxanthohumol" & hours==24) | (compounds=="Desmethyloxanthohumol" &  
hours==24) , by(type_of_cancer) random label(namevar=author, yearvar=year)
```

Αντιστοίχως για την κατηγορία των φλαβονών:

```
metan ic50 stde if (compounds=="Isoxanthohumol" & hours==24) |  
(compounds=="6-prenylnaringenin" & hours==24) | (compounds=="8-  
prenylnaringenin" & hours==24), by(type_of_cancer) random label(namevar=author,  
yearvar=year)
```

Για τα α-οξέα:

```
metan ic50 stde if (compounds=="Tetrahydro Iso-Alpha Acids" & hours==48) |  
(compounds=="α-acids" & hours==48) | (compounds=="Iso-α-acids" & hours==48) |  
(compounds=="Dihydro-iso-alpha acids" & hours==48) | (compounds=="Humulone"  
& hours==48) , by(type_of_cancer) random label(namevar=author, yearvar=year)
```

Για τα β-οξέα:

```
metan ic50 stde if compounds=="Lupulone" & hours==48, by(type_of_cancer)
random label(namevar=author, yearvar=year)
```

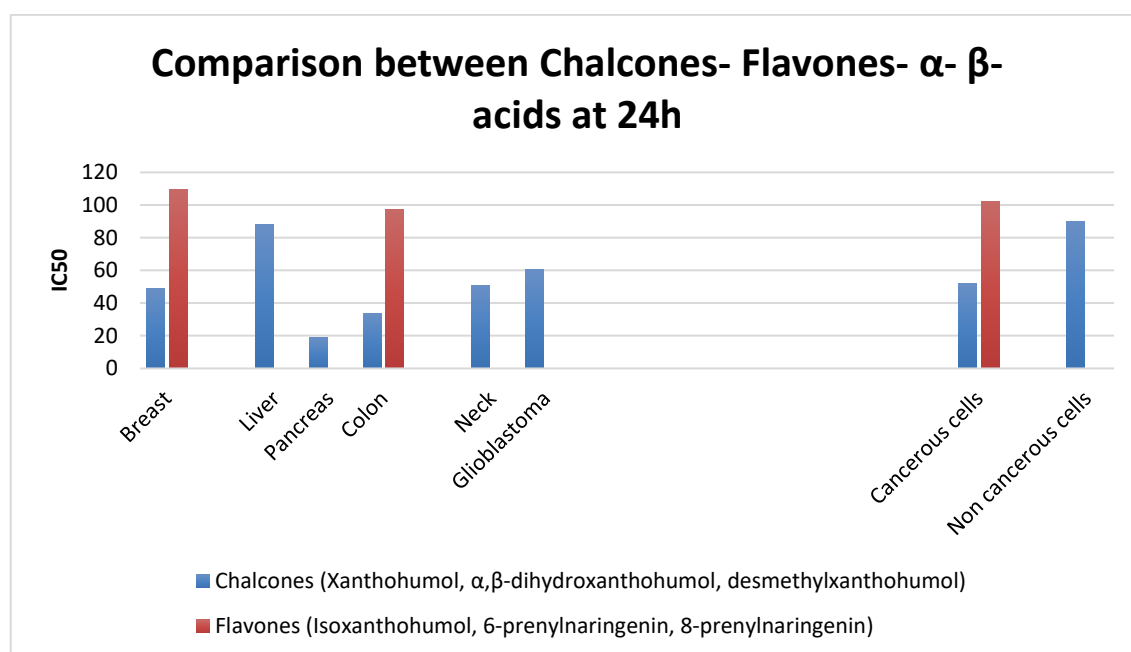
Τρέξαμε τις παραπάνω εντολές για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταξύ χημικών ενώσεων και ωρών και λάβαμε τα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης τυχαίων επιδράσεων. Παρουσιάζεται το συνολικό μέγεθος επίδρασης (IC50) μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης και την τιμή p-value, που προέκυψαν από την αντίστοιχη μετα-ανάλυση για μια συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων, τύπο καρκίνου και χρόνου επώασης. Τέλος, φαίνεται ο αριθμός των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μετα-ανάλυσης.

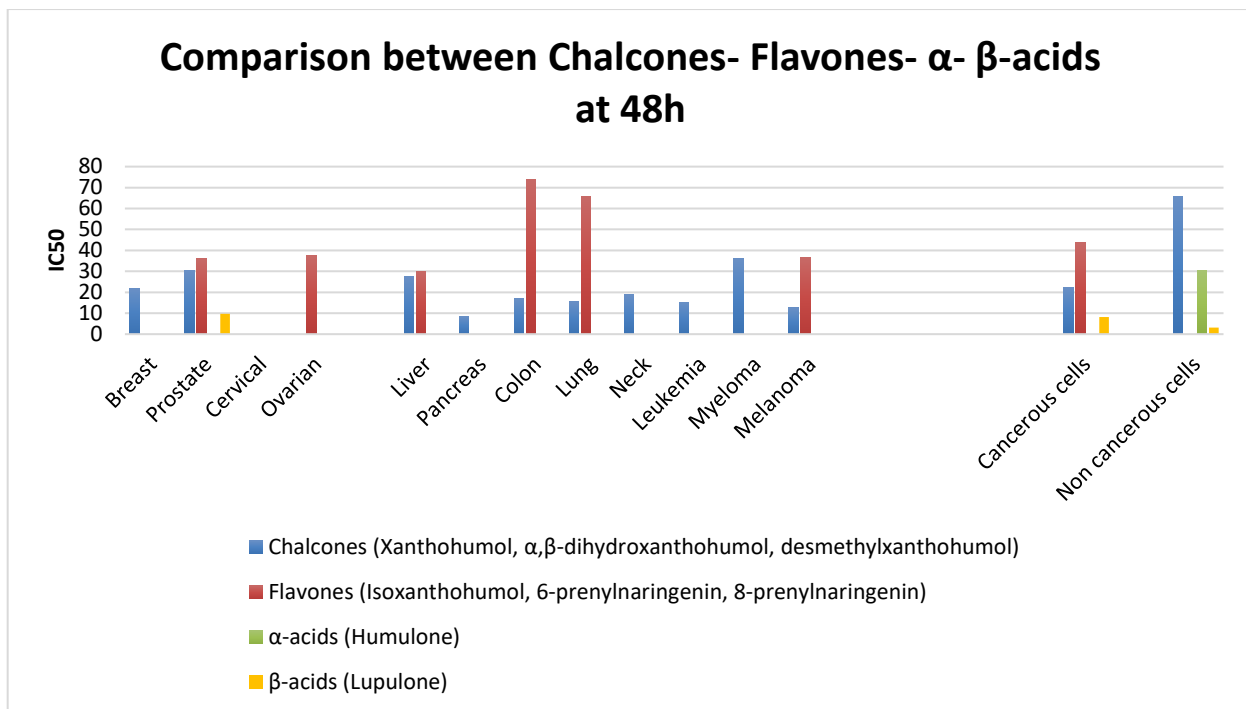
Group of Compounds	Time	Number of studies	Type of cancer	IC50	95% CI		p-value
					lower bound	upper bound	
Chalcones	24	5/	Colon	33.830	11.555	56.105	0.003
Chalcones	24	6/	Liver	88.078	52.804	123.352	0.000
Chalcones	24	2/	Neck	50.800	40.608	60.992	0.000
Chalcones	24	7/	Breast	48.974	29.381	68.567	0.000
Chalcones	24	5/	Glioblastoma	60.440	55.131	65.749	0.000
Chalcones	24	4/	Gastric	42.752	-3.383	88.888	0.069
Chalcones	24	2/	Pancreas	18.850	1.504	36.196	0.033
Chalcones	24	9/	No cancer	90.025	35.938	144.112	0.001
Chalcones	24	37/	Cancerous lines	52.162	42.663	61.661	0.000
Chalcones	48	6/	Colon	17.018	8.621	25.414	0.000
Chalcones	48	4/	Liver	27.685	7.894	47.477	0.006
Chalcones	48	5/	Melanoma	12.543	8.890	16.197	0.000
Chalcones	48	7/	Breast	21.746	13.255	30.237	0.000
Chalcones	48	3/	Lung	15.495	3.176	27.814	0.014
Chalcones	48	2/	Cervix	21.271	-4.309	46.851	0.103
Chalcones	48	2/	Ovarian	8.257	-6.913	23.427	0.286
Chalcones	48	2/	Bone	72.792	-12.270	157.855	0.093
Chalcones	48	4/	Neck	18.925	14.112	23.738	0.000
Chalcones	48	3/	Leukemia	15.219	9.545	20.893	0.000
Chalcones	48	2/	Myeloma	35.985	8.281	63.689	0.011
Chalcones	48	5/	Prostate	30.674	10.981	50.367	0.002

Chalcones	48	2/	Pancreas	8.600	2.759	14.441	0.004
Chalcones	48	14/	No cancer	65.534	48.748	82.319	0.000
Chalcones	48	50/	Cancerous lines	22.535	18.063	27.007	0.000
Chalcones	72	10/	Colon	23.291	19.582	26.999	0.000
Chalcones	72	17/	Breast	10.964	9.785	12.142	0.000
Chalcones	72	4/	Liver	39.792	-3.433	83.017	0.071
Chalcones	72	2/	Lung	17.018	9.822	24.214	0.000
Chalcones	72	4/	Ovarian	5.733	1.899	9.566	0.003
Chalcones	72	12/	Prostate	13.506	11.368	15.643	0.000
Chalcones	72	5/	Pancreas	11.863	7.163	16.563	0.000
Chalcones	72	2/	Neck	18.650	12.809	24.491	0.000
Chalcones	72	3/	Leukemia	6.587	3.263	9.911	0.000
Chalcones	72	11/	No cancer	33.885	15.152	52.618	0.000
Chalcones	72	63/	Cancerous lines	15.925	14.420	17.430	0.000
Flavones	24	2/	Breast	109.675	99.896	119.454	0.000
Flavones	24	3/	Colon	97.155	31.765	162.545	0.004
Flavones	24	5/	Cancerous lines	102.258	62.778	141.739	0.000
Flavones	48	12/	Melanoma	36.806	29.993	43.620	0.000
Flavones	48	2/	Liver	30.140	28.342	31.939	0.000
Flavones	48	4/	Colon	74.050	56.906	91.194	0.000
Flavones	48	3/	Lung	65.828	47.942	83.713	0.000
Flavones	48	3/	Ovarian	37.413	25.108	49.718	0.000
Flavones	48	6/	Prostate	36.118	27.467	44.768	0.000
Flavones	48	32/	Cancerous lines	43.764	38.889	48.639	0.000
Flavones	72	13/	Breast	35.553	27.150	43.957	0.000
Flavones	72	9/	Colon	50.547	33.007	68.086	0.000
Flavones	72	6/	Ovarian	36.190	26.645	45.735	0.000
Flavones	72	7/	Prostate	62.836	55.132	70.540	0.000
Flavones	72	7/	No cancer	46.963	31.083	62.844	0.000
Flavones	72	2/	Uterus	23.155	9.044	37.267	0.001
Flavones	72	39/	Cancerous lines	42.951	36.909	48.993	0.000
α -acids	48	2/	No cancer	30.671	28.101	33.241	0.000
α -acids	72	7/	Breast	16.057	10.238	21.876	0.000
α -acids	72	7/	Cancerous lines	16.058	10.239	21.877	0.000
β -acids	48	2/	Prostate	9.750	8.280	11.220	0.000
β -acids	48	2/	No cancer	3.100	2.120	4.080	0.000
β -acids	48	4/	Cancerous lines	8.201	4.773	11.630	0.000
β -acids	72	2/	Prostate	5.000	4.600	5.400	0.000
β -acids	72	2/	Prostate	5.000	4.600	5.400	0.000

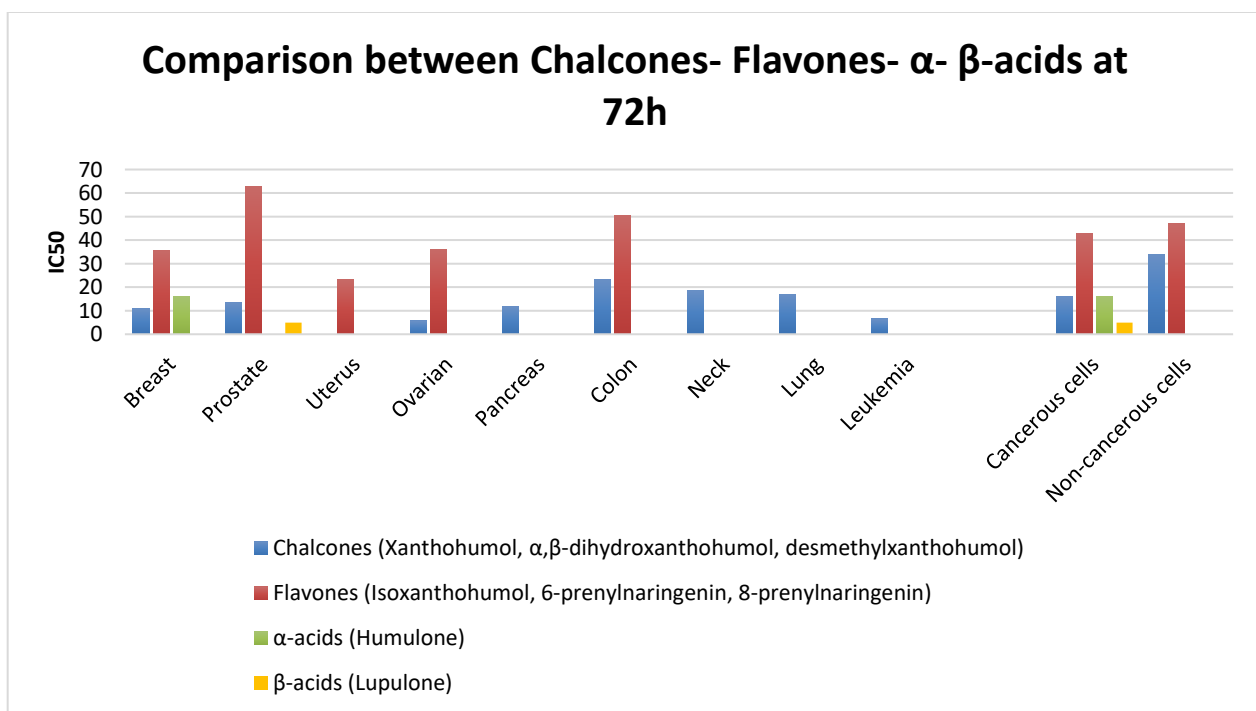
Για τον εποπτικό έλεγχο της δράσης της κάθε ομάδας χημικών ενώσεων στους διαφόρους τύπους καρκίνου και για κάθε ένα από τα χρονικά διαστήματα 24, 48, 72 ώρες δημιουργήθηκαν γραφήματα με τις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν από την μετα-ανάλυση (εικόνες 37, 38, 39).



Εικόνα 37- Σύγκριση τιμών IC₅₀ για τις χαλκόνες, φλαβόνες, άλφα και βήτα οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 24 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρατηρούμε τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης που προέκυψαν για τις χαλκόνες, ενώ με κόκκινο για τις φλαβόνες.



Εικόνα 38- Σύγκριση τιμών IC50 για τις χαλκόνες, φλαβόνες, άλφα και βήτα οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 48 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρατηρούμε τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης που προέκυψαν για τις χαλκόνες, ενώ με κόκκινο για τις φλαβόνες, με πράσινο για τα άλφα-οξέα και με κίτρινο για τα βήτα-οξέα.



Εικόνα 39- Σύγκριση τιμών IC50 για τις χαλκόνες, φλαβόνες, άλφα και βήτα οξέα όπως προκύπτουν από την μετα-ανάλυση με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για τις 72 ώρες επώασης. Με μπλε χρώμα παρατηρούμε τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης που προέκυψαν για τις χαλκόνες, ενώ με κόκκινο για τις φλαβόνες, με πράσινο για τα άλφα-οξέα και με κίτρινο για τα βήτα-οξέα.

Όπως μπορούμε ευκόλως να παρατηρήσουμε σε οποιαδήποτε ώρα, η αντικαρκινική δράση των χαλκονών είναι ισχυρότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες χημικών ενώσεων. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού στις 72 ώρες οι χαλκόνες έχουν IC50 ίσο με 10.9 μM (95% CI: 9.7, 12.1) σε 17 μελέτες, οι φλαβόνες έχουν 35.5 μM (95% CI: 27.1, 43.9) σε 13 μελέτες, ενώ τα α -οξέα έχουν 16 μM (95% CI: 10.2, 21.8) σε 7 μελέτες. Ο μοναδικός τύπος καρκίνου όπου οι χαλκόνες δεν έχουν καλύτερη δράση, είναι στον καρκίνο του προστάτη όπου οι χαλκόνες παρουσιάζουν IC50 ίσο με 13.5 μM (95% CI: 11.3, 15.6) σε 12 μελέτες, ενώ τα β -οξέα έχουν 5 μM (95% CI: 4.6, 5.4) σε 2 μελέτες. Όμως, η σύγκριση τους δεν είναι ορθή καθώς το αποτέλεσμα των β -οξέων έχει χαμηλή στατιστική ισχύ καθώς χρησιμοποιήθηκαν μόνο 2 μελέτες έναντι 12. Επιπλέον, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι χαλκόνες έχουν την ικανότητα να είναι πιο αποτελεσματικές στις καρκινικές κυτταρικές σειρές απ' ό,τι στις υγιείς. Πιο συγκεκριμένα, στις 24 ώρες το IC50 για τα καρκινικά κύτταρα είναι 52.1 μM (95% CI: 42.6, 61.6) σε 37 μελέτες, ενώ στα υγιή είναι 90 μM (95% CI: 35.9, 144.1) σε 9 μελέτες. Επίσης, στις 48 ώρες η αντίστοιχη τιμή για τα καρκινικά κύτταρα είναι 22.5 μM (95% CI: 18, 27) σε 50 μελέτες, ενώ για τα υγιή κύτταρα είναι 65.5 μM (95% CI: 48.7, 82.3) σε 14 μελέτες. Στις 72 ώρες το IC50 για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι 15.9 μM (95% CI: 14.4, 17.4) σε 63 μελέτες και στα κανονικά κύτταρα είναι 33.8 μM (95% CI: 15.1, 52.6) σε 11 μελέτες. Τέλος, με το συγκεκριμένο παράδειγμα φαίνεται και η επίδραση που έχει ο χρόνος στη αντικαρκινική δράση των χαλκονών. Δηλαδή, στις 24, 48 και 72 ώρες οι τιμές IC50 για τα καρκινικά κύτταρα ήταν 52.1, 22.5, 15.9 μM , αντιστοίχως.

3.11. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των φλαβονοειδών, πικρών οξέων, χαλκονών, φλαβονών και των α- β- οξέων ανάμεσα στις καρκινικές και τις κανονικές κυτταρικές σειρές

Τα αποτελέσματα των μετα-αναλύσεων για τις κατηγοριοποιήσεις των χημικών ενώσεων, πρώτα σε φλαβονοειδή και πικρά οξέα και έπειτα σε χαλκόνες, φλαβόνες, α- και β- οξέα, υποδεικνύουν μια επιλεκτική δράση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το ζήτημα που προέκυψε είναι εάν οι διαφορές μεταξύ των τιμών IC50 για τα καρκινικά και τα υγιή κύτταρα είναι στατιστικά σημαντικές. Για τον λόγο αυτόν, εκτελέσαμε ανάλυση παλινδρόμησης, στις κατηγορίες των χημικών ενώσεων για τις οποίες έχουμε δεδομένα τόσο στα καρκινικά όσο και στα κανονικά κύτταρα. Οι εντολές που χρησιμοποιούμε είναι οι εξής:

- Για τα φλαβονοειδή:

```
metareg ic50 cancer_or_non if (compounds=="Xanthohumol" & hours==24) |  
(compounds=="Isoxanthohumol" & hours==24) | (compounds=="6-prenylnaringenin"  
& hours==24) | (compounds=="8-prenylnaringenin" & hours==24) |  
(compounds=="α,β-dihydroxanthohumol" & hours==24) |  
(compounds=="Desmethyloxanthohumol" & hours==24), wsse(stde) mm graph
```

- Για τις χαλκόνες:

```
metareg ic50 cancer_or_non if (compounds=="Xanthohumol" & hours==24) |  
(compounds=="α,β-dihydroxanthohumol" & hours==24) |  
(compounds=="Desmethyloxanthohumol" & hours==24), wsse(stde) mm graph
```

- Για τις φλαβόνες:


```
metareg ic50 cancer_or_non if (compounds=="Isoxanthohumol" & hours==72) |  
(compounds=="6-prenylnaringenin" & hours==72) | (compounds=="8-  
prenylnaringenin" & hours==72), wsse(stde) mm graph
```

Τρέξαμε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς και για τις υπόλοιπες ώρες επώασης και τα αποτελέσματα που λάβαμε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16. Ανάλυση μετα-παλινδρόμησης για την διερεύνηση της δράσης των ομάδων των χημικών ενώσεων μεταξύ καρκινικών και υγιών κυττάρων για κάθε ώρα επώασης. Επιπλέον, φαίνεται η τιμή p-value.

Group of compounds	Hours	p-value
Flavonoids	24	0.162
Flavonoids	48	0.000
Flavonoids	72	0.150
Chalcones	24	0.049
Chalcones	48	0.000
Chalcones	72	0.019
Flavones	72	0.712
β-acids	48	0.129

Στην κατηγορία των φλαβονοειδών η διαφορά μεταξύ των καρκινικών και των κανονικών κυττάρων φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική μόνο στις 48 ώρες, ενώ στις 24 και τις 72 ώρες επώασης η διαφορά παρουσιάζεται ως μη σημαντική. Από την άλλη, στην κατηγορία των χαλκονών παρατηρούμε ότι οι διαφορές στις IC50 τιμές είναι σημαντικές σε όλες τις πιθανές ώρες επώασης. Αυτό είναι ένα αναμενόμενο γεγονός, καθώς σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι χημικές ενώσεις με την ισχυρότερη ανασταλτική δράση, η ξανθοχουμόλη και η α,β-διϋδροξανθοχουμόλη. Στις φλαβόνες και στα β-οξέα για τις 72 και 48 ώρες αντίστοιχα, η διαφορά μεταξύ καρκινικών και κανονικών κυττάρων λογίζεται ως μη σημαντική.

Συγκεντρωτικά, μεταξύ αυτών των κατηγοριών μόνο οι χαλκόνες έχουν την δυνατότητα να επιδρούν πιο αποτελεσματικά, με στατιστικά σημαντική διαφορά, στα καρκινικά κύτταρα απ' ότι στα υγιή, σε όλες τις πιθανές ώρες επώασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συζήτηση

Ο λυκίσκος είναι ένα πολυετές δίοικο φυτό το οποίο ανήκει στην οικογένεια των κανναβινοειδών. Είναι γνωστό στο ευρύ κοινό κυρίως για τα πλεονεκτήματα που προσφέρει κατά την διαδικασία της ζυθοποιίας, όπως είναι η χαρακτηριστική πικρή γεύση, το άρωμα, αλλά και οι αντισηπτικές ιδιότητες του. Παρ' όλα αυτά, ο λυκίσκος και ιδιαίτερα οι θηλυκοί του κώνοι φαίνεται να παρουσιάζουν ορισμένες ευεργετικές ιδιότητες, οι οποίες συσχετίζονται με την παθοφυσιολογία του ανθρώπου. Τέτοιες είναι οι καταπραϋντικές, οιστρογόνες, αντιμικροβιακές δράσεις αλλά και οι αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες.

Στην παρούσα μετα-ανάλυση έγινε μια προσπάθεια να αναδειχθούν οι αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες των χημικών ενώσεων του λυκίσκου, αξιολογώντας τον δείκτη IC50. Επιπλέον, θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση που μπορεί να έχουν διάφοροι παράγοντες (μέθοδος, χρόνος επώασης, χημική ένωση), οι οποίοι αφορούν τον σχεδιασμό ενός *in vitro* πειράματος, στο τελικό αποτέλεσμα. Για τον σκοπό αυτό έγινε ποσοτική σύνοψη συνολικά 61 μελετών από τις οποίες έγινε εξόρυξη 317 διαφορετικών *in vitro* πειραμάτων τόσο σε καρκινικές όσο και σε μη καρκινικές κυτταρικές σειρές. Υπήρξαν καταγραφές για διάφορες χημικές ενώσεις με αυτή που καταλαμβάνει μεγαλύτερο ποσοστό να είναι η ξανθοχουμόλη. Καταλήξαμε στην αξιολόγηση τριών διαφορετικών μεθόδων μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, την SRB, τις μεθόδους που χρησιμοποιούν τα άλατα τετραζολίου και την Crystal Violet μέθοδο.

Μέσω της μετα-ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο χημικών ενώσεων για κάθε ένα χρονικό διάστημα επώασης (24, 48, 72 ώρες) η ξανθοχουμόλη φάνηκε να έχει την πιο ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση. Εξίσου σημαντική δράση έδειξε να έχει και η α,β -διϋδροξανθοχουμόλη, όμως ο περιορισμένος αριθμός μελετών που είχαμε στην κατοχή μας δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Η ίσο-ξανθοχουμόλη, η 8-πρενυλναρινγενίνη και η 6-πρενυλναρινγενίνη παρουσιάζουν μια μέση αντιπολλαπλασιαστική δράση σε όλους τύπους καρκίνου. Όσον αφορά την ξανθοχουμόλη, οι τιμές IC50 είναι πάντα χαμηλότερες στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή, ανεξαρτήτου μεθόδου και χρόνου επώασης.

Από τα πρώτα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης παρατηρήθηκε μια ομοιότητα στις τιμές IC50 μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων. Μέσω της ανάλυσης παλινδρόμησης, αποδείξαμε ότι οι διαφορές που έχουν στις μεταξύ τους τιμές IC50 είναι στατιστικά μη σημαντικές. Συνεπώς, οι τρεις αυτές μέθοδοι μας παρέχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ισοδύναμα για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος είδαμε ότι προσδίδει στατιστική ετερογένεια, είναι ο χρόνος επώασης των κυττάρων με την αντίστοιχη χημική ένωση. Για τον λόγο αυτόν, μέσω της ανάλυσης μετα-παλινδρόμησης αποδείχθηκε ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επώασης τόσο πιο χαμηλές τιμές IC50 παρατηρούνται και άρα βελτιώνεται η αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα των χημικών ενώσεων.

Έπειτα, ομαδοποιήσαμε τις χημικές ενώσεις στις ευρύτερες κατηγορίες τους και επαναλήφθηκε η διαδικασία της μετα-ανάλυσης. Πρώτα, κατηγοριοποιήσαμε τις χημικές ενώσεις σε φλαβονοειδή και πικρά οξέα και έπειτα σε χαλκόνες, φλαβόνες, α-οξέα και β-οξέα. Τα πικρά οξέα έχουν ισχυρότερη δράση σε σύγκριση με τα φλαβονοειδή, όμως και σε αυτή την περίπτωση ο αριθμός των μελετών που κάνουν αναφορά σε αυτά είναι πολύ περιορισμένος. Ακόμη, οι χαλκόνες μέσα από την μετα-ανάλυση αποδείχθηκαν καλύτεροι ανασταλτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ παράλληλα δρουν καλύτερα, με στατιστικά σημαντική διαφορά, στα καρκινικά κύτταρα από 'τι τα υγιή.

Η ξανθοχουμόλη είναι η χημική ένωση με την καλύτερη ανασταλτική δράση στην κυτταρική ανάπτυξη, καθώς επίσης έχει την ικανότητα να είναι πιο αποτελεσματική στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή. Θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες για την συστηματική διερεύνηση της επίδρασης και των υπόλοιπων χημικών ενώσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Βιβλιογραφία

1. Petruzzello M. Cannabaceae. Encyclopedia Britannica 2019
<https://www.britannica.com/plant/Cannabaceae> (8 December 2022, date last accessed).
2. Behre KE. The history of beer additives in Europe — A review. *Veg Hist Archaeobot* 1999; 8: 35–48.
3. Humulus Lupulus Λυκίσκος. Άγρια Μανιτάρια 2019
<https://www.agriamanitaria.gr/humulus-lupulus-%CE%BB%CF%85%CE%BA%CE%AF%CF%83%CE%BA%CE%BF%CF%82-%CE%B2%CF%8C%CF%84%CE%B1%CE%BD%CE%B1-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%B8%CE%B5%CF%81%CE%B1%CF%80%CE%B5%CE%AF%CE%B1/> (10 December 2022, date last accessed).
4. Beer Hops (Humulus Lupulus) 60 seeds. Hobby seeds
<https://www.hobbyseeds.com/humulus-lupulus-beer-hops-60.html> (10 December 2022, date last accessed).
5. Humulus lupulus. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
http://mediplantepirus.med.uoi.gr/pharmacology/plant_details.php?id=293 (10 December 2022, date last accessed).
6. Murakami A, Darby P, Javornik B *et al.* Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. *Heredity* (Edinb) 2006; 97: 66–74.
7. HOP GENDER IDENTIFICATION. 2013
<https://www.greatlakeshops.com/hops-blog/hop-identification> (8 December 2022, date last accessed).
8. Wang G, Tian L, Aziz N *et al.* Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol* 2008; 148: 1254–66.
9. Wikipedia contributors. Hops — Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2022.
10. Bocquet L, Sahpaz S, Hilbert JL, Rambaud C, Rivière C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry reviews* v. 17.
11. Knez Hrnčič M, Španinger E, Košir IJ, Knez Ž, Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients* 2019; 11.
12. Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016; 15: 542–567.
13. Jeliaskova E, D Zheljaskov V, Kačaniova M, Astatkie T, L Tekwani B. Sequential Elution of Essential Oil Constituents during Steam Distillation of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Influence on Oil Yield and Antimicrobial Activity. *J Oleo Sci* 2018; 67: 871–883.
14. WILSON DGAY. PLANT REMAINS FROM THE GRAVENEY BOAT AND THE EARLY HISTORY OF HUMULUS LUPULUS L. IN W. EUROPE. *New Phytologist* 1975; 75: 627–648.
15. All Types of Hops: Aroma, Noble, Bittering & Dual Purpose. Beer Maverick 2022 <https://beermaverick.com/types-of-hops-aroma-noble-bittering-dual-purpose/> (8 December 2022, date last accessed).

16. IBUS. The Brew Enthusiast <https://www.thebrewenthusiast.com/ibus> (8 December 2022, date last accessed).
17. Kenny I. Beer Foam- what you need to know. MURPHY & SON 2019.
18. Štulíková K, Karabín M, Nešpor J, Dostálek P. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. *Molecules* 2018; 23.
19. Jiang C-H, Sun T-L, Xiang D-X, Wei S-S, Li W-Q. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). *Front Pharmacol* 2018; 9: 530.
20. Tronina T, Popłoński J, Bartmańska A. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules* 2020; 25.
21. Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnol Adv* 2015; 33: 1063–90.
22. Cancer. World Health Organization https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (8 December 2022, date last accessed).
23. Murphy SL, Kochanek KD, Xu J, Arias E. Mortality in the United States, 2020. *NCHS data brief* 2021; 1–8.
24. Cancer. World Health Organization 2022 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (8 December 2022, date last accessed).
25. What Is Cancer? was originally published by the National Cancer Institute. NATIONAL CANCER INSTITUTE 2021 <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (8 December 2022, date last accessed).
26. What is Cancer? Cusabio <https://www.cusabio.com/cancer.html> (8 December 2022, date last accessed).
27. 'Cooper G. The Cell: A Molecular Approach - The Development and Causes of Cancer. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
28. 'Eldridge L. Cancer Cells vs. Normal Cells: How Are They Different? 2022 <https://www.verywellhealth.com/cancer-cells-vs-normal-cells-2248794> (9 December 2022, date last accessed).
29. Hormone Therapy to Treat Cancer. National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy> (9 December 2022, date last accessed).
30. Surgery to Treat Cancer. National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery> (9 December 2022, date last accessed).
31. What is a Bone Marrow Transplant (Stem Cell Transplant)? Cancer.Net.
32. Chemotherapy to Treat Cancer. National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy> (9 December 2022, date last accessed).
33. Radiation Therapy to Treat Cancer. National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy> (9 December 2022, date last accessed).
34. Immunotherapy to Treat Cancer. National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy> (9 December 2022, date last accessed).
35. Cancer treatment. Mayo Clinic 2022 <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/cancer-treatment/about/pac-20393344> (9 December 2022, date last accessed).
36. Gordon JL, Brown MA, Reynolds MM. Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases* (Basel, Switzerland) 2018; 6.

37. Stringer JL. anticancer drug. Encyclopedia Britannica 2018
<https://www.britannica.com/science/anticancer-drug> (9 December 2022, date last accessed).
38. Skehan P, Storeng R, Scudiero D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 1990; 82: 1107–12.
39. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols* 2006; 1: 1112–6.
40. SRB Cytotoxicity Assay Kit, Colorimetric. Cepham Life Sciences
<https://www.cephamls.com/srb-cytotoxicity-assay-kit-colorimetric/> (9 December 2022, date last accessed).
41. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio-protocol* 2016; 6.
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983; 65: 55–63.
43. Aleshin VA, Artiukhov A v, Oppermann H, Kazantsev A v, Lukashev N v, Bunik VI. Mitochondrial Impairment May Increase Cellular NAD(P)H: Resazurin Oxidoreductase Activity, Perturbing the NAD(P)H-Based Viability Assays. *Cells* 2015; 4: 427–51.
44. MTT assay. Labster theory 2018 <https://theory.labster.com/mtt-assay/> (9 December 2022, date last accessed).
45. Wikipedia contributors. MTT assay — Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2022
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=MTT_assay&oldid=1115065773.
46. Mazloun-Ardakani M, Barazesh B, Moshtaghioun SM, Sheikha MH. Designing and optimization of an electrochemical substitute for the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cell viability assay. *Scientific reports* 2019; 9: 14966.
47. Fiorentino F. Crystal Violet Solution for Colony Formation Assays. Biocompare 2020.
48. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016: pdb.prot087379.
49. Neutral Red Uptake. Insitute of in vitro sciences
<https://iivs.org/assays/cytotoxicity/neutral-red-uptake/> (11 December 2022, date last accessed).
50. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008; 3: 1125–31.
51. Cell Viability and Proliferation Assays. Merck
<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/cell-viability-and-proliferation> (9 December 2022, date last accessed).
52. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111: A3.B.1-A3.B.3.
53. Gordon JL, Brown MA, Reynolds MM. Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases* 2018; 6.
54. ATP Assays. Promega <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/atp-assays/> (9 December 2022, date last accessed).

55. Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry* 2016; 508: 97–103.
56. 50% of what? How exactly are IC50 and EC50 defined? GraphPad 2010 <https://www.graphpad.com/support/faq/50-of-what-how-exactly-are-ic50-and-ec50-defined/> (9 December 2022, date last accessed).
57. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics* 2011; 10: 128–34.
58. GALANIS P. Systematic review and meta-analysis. *Archives of Hellenic Medicine* 2009.
59. Fagard RH, Staessen JA, Thijs L. Advantages and disadvantages of the meta-analysis approach. *J Hypertens Suppl* 1996; 14: S9-12; discussion S13.
60. Khan KS, Kunz R, Kleijnen J, Antes G. Five steps to conducting a systematic review. *J R Soc Med* 2003; 96: 118–21.
61. Uman LS. Systematic reviews and meta-analyses. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2011; 20: 57–9.
62. Delgado-Rodríguez M, Sillero-Arenas M. Systematic review and meta-analysis. *Med Intensiva* 2018; 42: 444–453.
63. Crowther M, Lim W, Crowther MA. Systematic review and meta-analysis methodology. *Blood* 2010; 116: 3140–6.
64. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009; 6: e1000097.
65. Bradburn MJ, Deeks JJ, Altman DG. metan-an alternative meta-analysis command. *Stata Technical Bulletin* 1999; 8.
66. Barili F, Parolari A, Kappetein PA, Freemantle N. Statistical Primer: heterogeneity, random- or fixed-effects model analyses? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2018; 27: 317–321.
67. Hazra A. Using the confidence interval confidently. *J Thorac Dis* 2017; 9: 4125–4130.
68. Harbord RM, Higgins JPT. Meta-Regression in Stata. *Stata J* 2008; 8: 493–519.
69. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. Routledge, 1988.
70. Groenwold RHH, White IR, Donders ART, Carpenter JR, Altman DG, Moons KGM. Missing covariate data in clinical research: when and when not to use the missing-indicator method for analysis. *CMAJ* 2012; 184: 1265–9.
71. Donders ART, van der Heijden GJMG, Stijnen T, Moons KGM. Review: a gentle introduction to imputation of missing values. *J Clin Epidemiol* 2006; 59: 1087–91.
72. Cox NJ. A Brief History of Stata on its 20th Anniversary. *Stata J* 2005; 5: 2–18.
73. Stata: Release 17. Statistical Software. StataCorp 2021 <https://www.stata.com/manuals/u.pdf> (10 December 2022, date last accessed).
74. Hsieh M-Y, Hsieh M-J, Lo Y-S *et al.* Xanthohumol targets the JNK1/2 signaling pathway in apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells. *Environmental toxicology* 2022; 37: 1509–1520.
75. Klimek K, Tyśkiewicz K, Miazga-Karska M, Dębczak A, Rój E, Ginalska G. Bioactive Compounds Obtained from Polish ‘Marynka’ Hop Variety Using Efficient Two-Step Supercritical Fluid Extraction and Comparison of Their

- Antibacterial, Cytotoxic, and Anti-Proliferative Activities In Vitro. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2021; 26.
76. Hitzman RT, Dunlap TL, Howell CE *et al.* 6-Prenylnaringenin from Hops Disrupts ER α -Mediated Downregulation of CYP1A1 to Facilitate Estrogen Detoxification. *Chemical research in toxicology* 2020; 33: 2793–2803.
 77. Yin S, Song M, Zhao R *et al.* Xanthohumol Inhibits the Growth of Keratin 18-Overexpressed Esophageal Squamous Cell Carcinoma in vitro and in vivo. *Frontiers in cell and developmental biology* 2020; 8: 366.
 78. Ho K-H, Kuo T-C, Lee Y-T *et al.* Xanthohumol regulates miR-4749-5p-inhibited RFC2 signaling in enhancing temozolomide cytotoxicity to glioblastoma. *Life sciences* 2020; 254: 117807.
 79. Scagliarini A, Mathey A, Aires V, Delmas D. Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops, Induces DNA Damages in Colorectal Cancer Cells and Sensitizes SW480 Cells to the SN38 Chemotherapeutic Agent. *Cells* 2020; 9.
 80. Stompor M, Świtalska M, Wietrzyk J. The influence of a single and double biotinylation of xanthohumol on its anticancer activity. *Acta biochimica Polonica* 2019; 66: 559–565.
 81. Lu X, Geng J, Zhang J, Miao J, Liu M. Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops, Induces Caspase-Dependent Degradation of Oncoprotein BCR-ABL in K562 Cells. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 2019; 8.
 82. Sławińska-Brych A, Zdzisińska B, Czerwonka A *et al.* Xanthohumol exhibits anti-myeloma activity in vitro through inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis via the ERK and JNK-dependent mechanism, and suppression of sIL-6R and VEGF production. *Biochimica et biophysica acta General subjects* 2019; 1863: 129408.
 83. Koosha S, Mohamed Z, Sinniah A, Ibrahim ZA, Seyedan A, Alshawsh MA. Antiproliferative and apoptotic activities of 8-prenylnaringenin against human colon cancer cells. *Life sciences* 2019; 232: 116633.
 84. Krajnović T, Drača D, Kaluđerović GN *et al.* The hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol inhibits the formation of lung metastasis in B16-F10 murine melanoma model. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2019; 129: 257–268.
 85. Bocquet L, Sahpaz S, Bonneau N *et al.* Phenolic Compounds from *Humulus lupulus* as Natural Antimicrobial Products: New Weapons in the Fight against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Strains. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2019; 24.
 86. Roehrer S, Stork V, Ludwig C, Minceva M, Behr J. Analyzing bioactive effects of the minor hop compound xanthohumol C on human breast cancer cells using quantitative proteomics. *PloS one* 2019; 14: e0213469.
 87. Logan IE, Miranda CL, Lowry MB, Maier CS, Stevens JF, Gombart AF. Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Xanthohumol and Its Non-Estrogenic Derivatives in Colon and Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *International journal of molecular sciences* 2019; 20.
 88. Bartmańska A, Tronina T, Popłoński J, Milczarek M, Filip-Psurska B, Wietrzyk J. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2018; 23.
 89. Wei S, Sun T, Du J, Zhang B, Xiang D, Li W. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro. *Oncology reports* 2018; 40: 3213–3222.

90. Carvalho DO, Freitas J, Nogueira P *et al.* Xanthohumol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human thyroid cells. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 2018; 121: 450–457.
91. Ho K-H, Chang C-K, Chen P-H, Wang Y-J, Chang W-C, Chen K-C. miR-4725-3p targeting stromal interacting molecule 1 signaling is involved in xanthohumol inhibition of glioma cell invasion. Journal of neurochemistry 2018; 146: 269–288.
92. Popłoński J, Turlej E, Sordon S *et al.* Synthesis and Antiproliferative Activity of Minor Hops Prenylflavonoids and New Insights on Prenyl Group Cyclization. Molecules (Basel, Switzerland) 2018; 23.
93. Sun Z, Zhou C, Liu F *et al.* Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway in vivo and in vitro. Oncology letters 2018; 15: 908–916.
94. Saito K, Matsuo Y, Imafuji H *et al.* Xanthohumol inhibits angiogenesis by suppressing nuclear factor- κ B activation in pancreatic cancer. Cancer science 2018; 109: 132–140.
95. Stompor M, Świtalska M, Podgórski R, Uram Ł, Aebischer D, Wietrzyk J. Synthesis and biological evaluation of 4'-O-acetyl-isoxanthohumol and its analogues as antioxidant and antiproliferative agents. Acta biochimica Polonica 2017; 64: 577–583.
96. Liu M, Yin H, Qian X, Dong J, Qian Z, Miao J. Xanthohumol, a Prenylated Chalcone from Hops, Inhibits the Viability and Stemness of Doxorubicin-Resistant MCF-7/ADR Cells. Molecules (Basel, Switzerland) 2016; 22.
97. Gallo C, Dallaglio K, Bassani B *et al.* Hop derived flavonoid xanthohumol inhibits endothelial cell functions via AMPK activation. Oncotarget 2016; 7: 59917–59931.
98. Chen P-H, Chang C-K, Shih C-M *et al.* The miR-204-3p-targeted IGFBP2 pathway is involved in xanthohumol-induced glioma cell apoptotic death. Neuropharmacology 2016; 110: 362–375.
99. Lempereur M, Majewska C, Brunquers A *et al.* Tetrahydro-iso-alpha Acids Antagonize Estrogen Receptor Alpha Activity in MCF-7 Breast Cancer Cells. International journal of endocrinology 2016; 2016: 9747863.
100. Yoo YB, Park KS, Kim JB *et al.* Xanthohumol inhibits cellular proliferation in a breast cancer cell line (MDA-MB231) through an intrinsic mitochondrial-dependent pathway. Indian journal of cancer 2014; 51: 518–23.
101. Krajnović T, Kaluđerović GN, Wessjohann LA, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: Enhancement of paclitaxel activity in vivo. Pharmacological research 2016; 105: 62–73.
102. Yong WK, Ho YF, Malek SNA. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. Pharmacognosy magazine 2015; 11: S275-83.
103. Zhang B, Chu W, Wei P, Liu Y, Wei T. Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I. Free radical biology & medicine 2015; 89: 486–97.
104. Sławińska-Brych A, Król SK, Dmoszyńska-Graniczka M, Zdzińska B, Stepulak A, Gagoś M. Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells in vitro. Chemico-biological interactions 2015; 240: 110–8.

105. Jiang W, Zhao S, Xu L *et al.* The inhibitory effects of xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, on cell growth and tumorigenesis in human pancreatic cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2015; 73: 40–7.
106. Zenger K, Dutta S, Wolff H, Genton MG, Kraus B. In vitro structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. *Toxicology* 2015; 336: 26–33.
107. Yong WK, Abd Malek SN. Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015; 2015: 921306.
108. Mouratidis PXE, Colston KW, Tucknott ML, Tyrrell E, Pirianov G. An investigation into the anticancer effects and mechanism of action of hop β -acid lupulone and its natural and synthetic derivatives in prostate cancer cells. *Nutrition and cancer* 2013; 65: 1086–92.
109. Boncler M, Różalski M, Krajewska U, Podsędek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2014; 69: 9–16.
110. Tronina T, Bartmańska A, Milczarek M *et al.* Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2013; 23: 1957–60.
111. Tronina T, Bartmańska A, Filip-Psurska B, Wietrzyk J, Popłoński J, Huszcza E. Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2013; 21: 2001–6.
112. Allsopp P, Possemiers S, Campbell D, Gill C, Rowland I. A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using in vitro models of colon cancer. *BioFactors (Oxford, England)* 2013; 39: 441–7.
113. Kang Y, Park MA, Heo S-W *et al.* The radio-sensitizing effect of xanthohumol is mediated by STAT3 and EGFR suppression in doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1830: 2638–48.
114. Viegas O, Zegura B, Pezdric M *et al.* Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2012; 50: 949–55.
115. Hemachandra LP, Madhubhani P, Chandrasena R *et al.* Hops (*Humulus lupulus*) inhibits oxidative estrogen metabolism and estrogen-induced malignant transformation in human mammary epithelial cells (MCF-10A). *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* 2012; 5: 73–81.
116. Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC. Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer research* 2010; 30: 3333–9.
117. Negrão R, Costa R, Duarte D *et al.* Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *Journal of cellular biochemistry* 2010; 111: 1270–9.
118. Wesołowska O, Wiśniewski J, Sroda K *et al.* 8-Prenylnaringenin is an inhibitor of multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1. *European journal of pharmacology* 2010; 644: 32–40.

119. Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JHM, Gerhäuser C. Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; 24: 2938–50.
120. Dorn C, Weiss TS, Heilmann J, Hellerbrand C. Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *International journal of oncology* 2010; 36: 435–41.
121. Mendes V, Monteiro R, Pestana D, Teixeira D, Calhau C, Azevedo I. Xanthohumol influences preadipocyte differentiation: implication of antiproliferative and apoptotic effects. *Journal of agricultural and food chemistry* 2008; 56: 11631–7.
122. Ho Y-C, Liu C-H, Chen C-N, Duan K-J, Lin M-T. Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytotherapy research : PTR* 2008; 22: 1465–8.
123. Monteghirfo S, Tosetti F, Ambrosini C *et al.* Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl-transformed cells involve nuclear factor-kappaB and p53 modulation. *Molecular cancer therapeutics* 2008; 7: 2692–702.
124. Koo J-H, Kim HT, Yoon H-Y *et al.* Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Experimental & molecular medicine* 2008; 40: 313–9.
125. Lee SH, Kim HJ, Lee JS, Lee I-S, Kang BY. Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol. from hops. *Archives of pharmacal research* 2007; 30: 1435–9.
126. Yang J-Y, Della-Fera MA, Rayalam S, Baile CA. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2007; 12: 1953–63.
127. Monteiro R, Faria A, Azevedo I, Calhau C. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2007; 105: 124–30.
128. Plazar J, Zegura B, Lah TT, Filipic M. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo(a)pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation research* 2007; 632: 1–8.
129. Delmulle L, Bellahcène A, Dhooze W *et al.* Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2006; 13: 732–4.
130. Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer letters* 2007; 246: 201–9.
131. Dietz BM, Kang Y-H, Liu G *et al.* Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chemical research in toxicology* 2005; 18: 1296–305.
132. Pan L, Becker H, Gerhäuser C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Molecular nutrition & food research* 2005; 49: 837–43.
133. Gerhäuser C, Alt A, Heiss E *et al.* Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular cancer therapeutics* 2002; 1: 959–69.

134. Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A *et al.* Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 1999; 37: 271–85.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Παράρτημα

6.1. Πειράματα τα οποία απορρίφθηκαν λόγω μοναδικότητας σε ορισμένα χαρακτηριστικά τους

Πίνακας 17-Μελέτες που αποκλείστηκαν από στο τελικό στάδιο, προτού γίνει η μετα-ανάλυση, εξαιτίας της μοναδικότητας των χημικών ενώσεων ή κάποιου από τα χαρακτηριστικά διεξαγωγής του πειράματος, όπως ο χρόνος επώασης ή η μέθοδος μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Στον πίνακα συμπεριλαμβάνεται το PubMed ID, η χρονολογία έκδοσης της δημοσίευσης, το όνομα του συγγραφέα, η μέθοδος μέτρησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, η μετρική IC50, οι ώρες έκθεσης των κυττάρων στην αντίστοιχη χημική ένωση, ο αριθμός επαναλήψεων του πειράματος, η κυτταρική γραμμή, ο κυτταρικός τύπος, ο αντίστοιχος καρκινικός τύπος και η χημική ένωση που χρησιμοποιήθηκε.

PMID	Year	Author	Assay	IC50	SD	Hours	Number of experiments	Cell line	Cell type	Type of cancer	Compounds
30857300	2019	Logan I E	SRB	34	1.3	24	5	HCT116	Human colon cancer	Colon	Tetrahydroxanthohumol
			SRB	34.9	1.1	24	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Tetrahydroxanthohumol
			SRB	27.1	1.1	24	5	HepG2	Human liver cancer	Liver	Tetrahydroxanthohumol
			SRB	26.5	1.1	24	5	Huh7	Human liver cancer	Liver	Tetrahydroxanthohumol
			SRB	28.7	1	24	5	HCT116	Human colon cancer	Colon	Dihydroxanthohumol
			SRB	31.4	1.1	24	5	HT-29	Human colon cancer	Colon	Dihydroxanthohumol
			SRB	21.7	1.1	24	5	HepG2	Human liver cancer	Liver	Dihydroxanthohumol
			SRB	32.5	1.3	24	5	Huh7	Human liver cancer	Liver	Dihydroxanthohumol
			SRB	49.56	5.45	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4,2'-dihydroxy-6'-methoxychalcone

23434138	2013	Tronina T	SRB	69.25	13.5 5	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4,2'- dihydroxy-6'-methoxychalcone
			SRB	90.52	3.46	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4,2'- dihydroxy-6'-methoxychalcone
			SRB	61.82	18.2 3	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4',2'- dihydroxy-6'-methoxy-a,b- dihydrochalcone
			SRB	64.55	9.32	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4',2'- dihydroxy-6'-methoxy-a,b- dihydrochalcone
			SRB	85.69	3.47	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':3',4']-4',2'- dihydroxy-6'-methoxy-a,b- dihydrochalcone
			SRB	105.64	13.3 1	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':7,8]-4'- hydroxy-5-methoxyflavanone
			SRB	141.87	41.4 2	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':7,8]-4'- hydroxy-5-methoxyflavanone
			SRB	90.52	3.46	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5'':7,8]-4'- hydroxy-5-methoxyflavanone
			SRB	48.31	13.8 9	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	(Z)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5''-6,7]-3',4'- dihydroxy-4-methoxyaurone
			SRB	117.25	30.3 1	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	(Z)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)- dihydrofurano-[4'',5''-6,7]-3',4'- dihydroxy-4-methoxyaurone

28803257	2017	Stompor M	SRB	114.13	9.65	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	(Z)-2''-(2'''-hydroxyisopropyl)-dihydrofurano-[4'',5''-6,7]-3',4'-dihydroxy-4-methoxyaurone
			SRB	21.81	6.98	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol H (3'-[3''-hydroxy-3''-methylbutyl]-4,2',4'-trihydroxy-6'-methoxychalcone)
			SRB	122.31	38.05	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol H (3'-[3''-hydroxy-3''-methylbutyl]-4,2',4'-trihydroxy-6'-methoxychalcone)
			SRB	32.1	4.8	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	29	2.65	72	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	49.6	14.5	72	3	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	38.7	4.4	72	3	MCF-10A	Human normal breast	No cancer	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	29.2	3.7	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	26.3	3.4	72	3	A549	Human lung cancer	Lung	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	11.1	4.6	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	9.8	3.6	72	3	LoVo	Human colon cancer	Colon	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	25.4	4.7	72	3	LoVo/DX	Human colon cancer doxorubicin-resistant	Colon	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	29.3	2.4	72	3	LoVo/DX	Human colon cancer doxorubicin-resistant	Colon	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	22.1	7.9	72	3	MES-SA	Human uterine cancer	Uterus	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			SRB	15.7	6.9	72	3	MES-SA	Human uterine cancer	Uterus	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			SRB	32.3	1.5	72	3	MES-SA/DX	Human uterine cancer doxorubicin-resistant	Uterus	4'-O-monoacylated isoxanthohumol

			SRB	28.6	2.1	72	3	MES-SA/DX	Human uterine cancer doxorubicin-resistant	Uterus	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			XTT	27.7		72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			NRU	15.4		72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	4'-O-monoacylated isoxanthohumol
			XTT	20.5		72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
			NRU	17.5		72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	7,4'-O-diacetylated isoxanthohumol
23466227	2013	Tronina T	SRB	51.35	13.17	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol 4'-O- β -D-glucopyranoside
			SRB	19.86	8.17	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol 4'-O- β -D-(4'''-Omethyl)-glucopyranoside
			SRB	146.5	15.02	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol 7-O- β -glucopyranoside
			SRB	58.06	7.65	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol 4'-O- β -D-glucopyranoside
			SRB	47.89	24.01	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol 4'-O- β -D-(4'''-Omethyl)-glucopyranoside
			SRB	63.64	2.28	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol 4'-O- β -D-glucopyranoside
			SRB	51.79	1.85	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol 4'-O- β -D-(4'''-Omethyl)-glucopyranoside
24168111	2013	Mouratidis p	MTT	17		72	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1c
			MTT	18		72	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1c
			MTT	20		48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1c
			MTT	30		48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1c
			MTT	3		72	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1h
			MTT	3		72	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1h

31820895	2019	Stompor M	MTT	4	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1h	
			MTT	3.5	48	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Lupulone derivative 1h	
			SRB	6.19	1.7	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	18.6	1.2	72	4	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	22.1	3.9	72	4	HepG2	Human liver cancer	Liver	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	6.64	0.4	72	4	4T1	Murine breast cancer	Breast	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	19.5	3.1	72	4	MCF-10A	Human normal breast	Breast	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	12.3	9	72	4	BALB/3T3	Murine normal fibroblasts	Breast	4-O-biotinylxanthohumol
			SRB	8.03	0.53	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
			SRB	16.9	1.6	72	4	MDA-MB-231	Human breast cancer	Breast	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
			SRB	17.37	5.1	72	4	HepG2	Human liver cancer	Liver	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
			SRB	5.35	1.5	72	4	4T1	Murine breast cancer	Breast	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
			SRB	16.8	2.5	72	4	MCF-10A	Human normal breast	Breast	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
			SRB	16.6	4	72	4	BALB/3T3	Murine normal fibroblasts	Breast	4,4'-di-O-biotinylxanthohumol
18087812	2007	Lee S O	SRB	38,7 µg/mL	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol 4'-O-13-D-glucopyranoside (XNG)	
			SRB	38,8 µg/mL	48	3	SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol 4'-O-13-D-glucopyranoside (XNG)	
			SRB	18,0 µg/mL	48	3	SK-MEL-2	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol 4'-O-13-D-glucopyranoside (XNG)	
			SRB	38,4 µg/mL	48	3	HCT15	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol 4'-O-13-D-glucopyranoside (XNG)	

29597299	2018	Popłoński J	SRB	9	6.4	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2''-Dihydroxanthohumol K
			SRB	83.8	14.6	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol K
			SRB	16.2	2.1	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol C
			SRB	36	3.6	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol K
			SRB	35.3	6.6	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2''-Dihydroisoxanthohumol C
			SRB	13.2	3.7	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	5,4'-Dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':7,8]flavanone and 5,4'-dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':6,7]flavanone
			SRB	120.1	3.6	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2,3-Dehydroisoxanthohumol C
			SRB	7.9	0.5	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2,3-Dehydroisoxanthohumol
			SRB	19.3	6.1	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2''-Dihydro-2,3-dehydroisoxanthohumol C
			SRB	10.7	5.9	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2''-Dihydroxanthohumol K
			SRB	74.9	25.6	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol K
			SRB	59.9	5.4	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol C
			SRB	68	14.2	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol K
			SRB	51.3	21.2	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2''-Dihydroisoxanthohumol C
			SRB	48.9	7.8	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	5,4'-Dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':7,8]flavanone and 5,4'-dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':6,7]flavanone

SRB	202	0	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	2,3-Dehydroisoxanthohumol C
SRB	13.8	1.4	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	2,3-Dehydroisoxanthohumol
SRB	64.6	10.7	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2''-Dihydro-2,3-dehydroisoxanthohumol C
SRB	12.5	1.5	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2''-Dihydroxanthohumol K
SRB	87.5	3.2	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol K
SRB	62.7	13.2	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol C
SRB	89.1	3.2	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2'', α , β -Tetrahydroxanthohumol K
SRB	85.4	2.1	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2''-Dihydroisoxanthohumol C
SRB	25.8	2.9	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	5,4'-Dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':7,8]flavanone and 5,4'-dihydroxy-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano-[2'',3'':6,7]flavanone
SRB	217.1	40.9	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2,3-Dehydroisoxanthohumol C
SRB	20.1	1.5	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2,3-Dehydroisoxanthohumol
SRB	91.2	17.2	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2''-Dihydro-2,3-dehydroisoxanthohumol C
SRB	64.5		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)
SRB	50.9		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
SRB	15.7		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	dehydrocycloxanthohumol (DX)
SRB	56.3		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)

10418944	1999	Miranda C L	SRB	48.57	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)
			SRB	55	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
			SRB	6.67	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	dehydrocycloxanthohumol (DX)
			SRB	64.6	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)
			SRB	1	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)
			SRB	35.7	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
			SRB	5	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	dehydrocycloxanthohumol (DX)
			SRB	7.17	48	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)
			SRB	53.7	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)
			SRB	53.7	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
			SRB	>10	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	dehydrocycloxanthohumol (DX)
			SRB	51.14	96	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)
			SRB	56.45	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)
			SRB	43.38	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
			SRB	47.74	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	dehydrocycloxanthohumol (DX)
			SRB	59.35	48	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)
			SRB	56.55	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-prenylchalcone (TP)

			SRB	53.44	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	2',4',6',4-tetrahydroxy-3'-geranylchalcone (TG)
			SRB	53.44	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	dehydrocycloxanthohumol (DX)
			SRB	53.44	96	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	dehydrocycloxanthohumol hydrate (DH)
16563612	2007	Colgate E C	MTT	13	48	4	BPH-1	Human benign prostatic hyperplasia	No cancer	Xanthoarenol
			MTT	18.2	48	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthoarenol
17715491	2007	Diller R A	Trypan blue	37	4	3	BJAB	Human lymphoma	Lymphoma	8-cinnamylnaringenin
18087817	2007	Yu B C	SRB	8.84			SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	methyl ferulate
			SRB	8.62			HCT15	Human colon cancer	Colon	methyl ferulate
			SRB	8.79			SK-OV-3	Human ovarian cancer	Ovarian	apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside
31386885	2019	Sławińska-Brych A	BrdU	44	48	3	U266	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol
			BrdU	17,3	48	3	RPMI8226	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol
26297991	2015	Sławińska-Brych A	BrdU	15	48	3	RK33	Human larynx cancer	Larynx	Xanthohumol
			BrdU	60	48	3	RK45	Human larynx cancer	Larynx	Xanthohumol
20803553	2010	Negrão R	BrdU	7	24	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Xanthohumol
			BrdU	5,3	24	3	HASMC	Human aortic smooth muscle	No cancer	Xanthohumol
			BrdU	2,5	24	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Isoxanthohumol
			BrdU	15	24	3	HASMC	Human aortic smooth muscle	No cancer	Isoxanthohumol
			BrdU	17	24	3	HASMC	Human aortic smooth	No cancer	8-prenylnaringenin

muscle										
33572775	2021	Seitz T	LDH	EC50 = 60	48	3	Mel Ju	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 50	72	3	Mel Ju	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 52	48	3	Mel Im	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 45	72	3	Mel Im	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol
31386885	2019	Sławińska-Brych A	LDH	EC50 = 30	48	3	U266	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 22,5	48	3	RPMI8226	Human myeloma	Myeloma	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 40,6	48	3	PBMC	Human normal leukocytes	No cancer	Xanthohumol
16403733	2006	Albini A	LDH	EC50 = 16,6	24	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 17,1	48	3	HUVEC	Human umbilical vein endothelial	No cancer	Xanthohumol
10418944	1999	Miranda C L	LDH	EC50 = 57,3	24	4		Rat hepatocytes	No cancer	Xanthohumol
			LDH	EC50 = 57,3	24	4		Rat hepatocytes	No cancer	Isoxanthohumol
14709013	2004	Chen W J	Luminescent ATP detection	8,67 µg/mL	24	3	HL-60	Human leukemia	Leukemia	Bitter acids: 49.39% α-acids, 24.94% β-acids
			Luminescent ATP detection	58,87 µg/mL	24	3	U937	Human leukemia	Leukemia	Bitter acids: 49.39% α-acids, 24.94% β-acids
			MUH	98.4	24	3	SK-MEL-28	Human melanoma	Melanoma	8-prenylNaringenin
			MUH	41.6	96	3	SK-MEL-28	Human melanoma	Melanoma	8-prenylNaringenin

30458450	2018	Venturelli S	MUH	74.8	24	3	BLM	Human melanoma	Melanoma	8-prenylNaringenin
			MUH	55.1	96	3	BLM	Human melanoma	Melanoma	8-prenylNaringenin
			MUH	63.4	24	3	SK-MEL-28	Human melanoma	Melanoma	6-prenylNaringenin
			MUH	37.4	96	3	SK-MEL-28	Human melanoma	Melanoma	6-prenylNaringenin
			MUH	39.2	24	3	BLM	Human melanoma	Melanoma	6-prenylNaringenin
			MUH	33.3	96	3	BLM	Human melanoma	Melanoma	6-prenylNaringenin
25925225	2015	Busch C	MUH	135	24	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylNaringenin
			MUH	71	24	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylNaringenin
			MUH	65	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylNaringenin
			MUH	53	48	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylNaringenin
			MUH	100	24	3	UO.31	Human renal cancer	Kidney	8-prenylNaringenin
			MUH	37.5	24	3	UO.31	Human renal cancer	Kidney	6-prenylNaringenin
			MUH	50	48	3	UO.31	Human renal cancer	Kidney	8-prenylNaringenin
			MUH	28.5	48	3	UO.31	Human renal cancer	Kidney	6-prenylNaringenin
			NRU	75.2	24	4	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	Xanthohumol
			NRU	>100	24	4	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	88.3	24	4	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	6-prenylNaringenin
			NRU	>100	24	4	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	8-prenylNaringenin

32708388	2020	Lněničková K	NRU	8.5	24	4	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	Xanthohumol
			NRU	56.6	24	4	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	25.3	24	4	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	6-prenylnaringenin
			NRU	59	24	4	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	8-prenylnaringenin
31010128	2019	Ambrož M	NRU	3.6	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol
			NRU	40.4	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	14.8	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	6-prenylnaringenin
			NRU	56.3	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin
			NRU	>200	72	3	SW480	Human colon cancer	Colon	Naringenin
			NRU	7.3	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol
			NRU	43.7	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	13.7	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	6-prenylnaringenin
			NRU	24.9	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	8-prenylnaringenin
			NRU	>200	72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Naringenin
			NRU	6.2	72	3	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	Xanthohumol
			NRU	47	72	3	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	24	72	3	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	6-prenylnaringenin
			NRU	48.9	72	3	CaCo-2	Human colon cancer proliferating	Colon	8-prenylnaringenin

			NRU	39.3	72	3	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	Xanthohumol
			NRU	>100	72	3	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	Isoxanthohumol
			NRU	61.9	72	3	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	6-prenylnaringenin
			NRU	>100	72	3	CaCo-2	Human colon cancer differentiated	Colon	8-prenylnaringenin
28803257	2017	Stompor M	NRU	10.5	72	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Isoxanthohumol
28665345	2017	Stompor M	NRU	211	24	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	Naringenin
			NRU	1090	24	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	Naringenin
			NRU	172	24	3	BJ	Human normal skin fibroblast	No cancer	8-prenylnaringenin
			NRU	138	24	3	U-118 MG	Human glioblastoma	Glioblastoma	8-prenylnaringenin
22946339	2012	Liu Y	Thymidine incorporation	8.2	72	3	EL-4	Murine lymphoma	Lymphoma	Xanthohumol
17643984	2007	Monteiro R	Thymidine incorporation	0.52	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Thymidine incorporation	0.88	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	8-prenylnaringenin
			Thymidine incorporation	25	72	9	Sk-Br-3	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Thymidine incorporation							
12481418	2002	Gerhauser C	Thymidine incorporation	37.5	48	3	MDA-MB-435	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol

10418944	1999	Miranda C L	Thymidine incorporation	12.8	24	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Thymidine incorporation	8.8	48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Thymidine incorporation	0.47	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Thymidine incorporation	3.7	24	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Thymidine incorporation	2	48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Thymidine incorporation	5.5	96	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
34965452	2022	Zanardi M V	Trypan blue	73.2 µg/ml	24	3	Ishikawa	Human endometrial cancer	Endometrium	Hop extract
34804373	2021	Wang C M	Trypan blue	16	24	3	HL-60	Human leukemia	Leukemia	Xanthohumol
30240731	2018	Carvalho D O	Trypan blue	51.9	48	4	TPC-1	Human thyroid cancer	Thyroid	Xanthohumol
26453927	2015	Zhang B	Trypan blue	16.5	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Xanthohumol
			Trypan blue	12	48	3	HeLa	Human cervical cancer	Cervix	Xanthohumol
			Trypan blue	35	48	3	HeLa	Human cervical cancer	Cervix	Isoxanthohumol
			Trypan blue	41	48	3	A549	Human lung cancer	Lung	Isoxanthohumol

17715491	2007	Diller R A	Trypan blue	83		4	3	BJAB	Human lymphoma	Lymphoma	8-geranylneringenin
17434926	2007	Lamy V	Trypan blue	43.17		48	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Lupulone
			Trypan blue	44.86		72	3	SW620	Human colon cancer	Colon	Lupulone
10418944	1999	Miranda C L	Trypan blue	88		8	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Trypan blue	26.8		24	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Trypan blue	0.2		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			Trypan blue	100		8	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Trypan blue	47.8		24	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Trypan blue	33.2		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
			Trypan blue	33.2		48	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Isoxanthohumol
9680110	1998	Honma Y	Trypan blue	3.4		144	3	U937	Human leukemia	Leukemia	Humulone
30875365	2019	Roehrer S	MTS	8,84		48	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	XN-enriched hop extract Xantho-Flav
			MTS	4,3		96	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	XN-enriched hop extract Xantho-Flav
			MTS	2,2		144	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	XN-enriched hop extract Xantho-Flav
18470798	2008	Whang W S	MTT	439,8	27,3	72	5	HepG2	Human liver cancer	Liver	Xanthohumol C
			MTT	380,24	28,2	72	5	BGC-823	Human stomach cancer	Stomach	Xanthohumol C
26201061	2015	Zenger K	MTT	69	3	24	3	HSC	Human hepatic stellate	No cancer	Xanthohumol C
			MTS	4,18		48	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol C

30875365	2019	Roehrer S	MTS	1,9		96	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol C
			MTS	1,7		144	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol C
26201061	2015	Zenger K	MTT	55	4	24	3	HSC	Human hepatic stellate	No cancer	1'',2''-dihydroxanthohumol C
25685448	2013	Farag M A	XTT	8,1 µg/ml	4,8	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	β-acids
			XTT	15,5 µg/ml	7,6	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	α-acids
			XTT	13,2 µg/ml		72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	α-acids
			XTT	2,4 µg/ml		72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	β-acids
18470798	2008	Whang W S	MTT	1.865, 55	110, 2	72	5	BGC-823	Human stomach cancer	Stomach	Xanthohumol D
22825405	2012	Saugspier M	XTT	48,5 µg/ml		24	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	α-extract : 57.2% α-acids, 18.3% β-acids
			XTT	32 µg/ml		24	3	HepG2	Human liver cancer	Liver	β-extract : 13.0% α-acids, 51.9% β-acids
17726738	2008	L Delmulle	WST-1	180		2	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin
			WST-1	250		2	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	6-prenylnaringenin
			WST-1	132		2	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol
			WST-1	123		2	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol
			WST-1	50		2	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol
			WST-1	163		2	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	Isoxanthohumol
			WST-1	90		2	3	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylnaringenin
			WST-1	181		2	3	DU145	Human prostate cancer	Prostate	8-prenylnaringenin

30875365	2019	Roehrer S	MTS	7.1		144	3	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
29597299	2018	Popłoński J	SRB	15.9	3.6	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	1'',2''-dihydroxanthohumol C
			SRB	16.7	6.9	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	1'',2''-dihydroxanthohumol C
			SRB	49.6	6.6	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	1'',2''-dihydroxanthohumol C
23434138	2013	Tronina T	SRB	20.6	0.22	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol D
			SRB	78.83	8.83	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol D
			SRB	37.88	13.9	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol D
29597299	2018	Popłoński J	SRB	15	1.8	72	4	MCF-7	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol C
			SRB	10.6	0.6	72	4	HT-29	Human colon cancer	Colon	Xanthohumol C
			SRB	10.1	3	72	4	PC-3	Human prostate cancer	Prostate	Xanthohumol C
10418944	1999	Miranda C L	SRB	6.7		144	4	A2780	Human ovarian cancer	Ovarian	Xanthohumol
15986430	2005	Vanhoecke B	SRB	23		192	2	MCF-7/6	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			SRB	2.5		192	2	T47-D	Human breast cancer	Breast	Xanthohumol
			SRB	15		192	2		Chick heart	No cancer	Xanthohumol
33572775	2021	Seitz T	CyQUANT NF	30.45			3	Mel Im	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol
			CyQUANT NF	31.66			3	Mel Ju	Human melanoma	Melanoma	Xanthohumol

