



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

*Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΟΣΤΡΥΧΟ
ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ
ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (DNA
MICROARRAYS)**



ΒΟΛΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

***ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΒΟΣΤΡΥΧΟ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ
ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (DNA MICROARRAYS)***

***EFFECTS OF GRAPE STEM EXTRACTS ON THE WHOLE GENE
EXPRESSION IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS USING
DNA MICROARRAYS ANALYSIS***

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος : Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Χαρουτουιάν Σέρκος: Καθηγητής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον λέκτορα κ. Στάγκο Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθεια και προθυμία του να με καθοδηγήσει και να λύσει κάθε απορία μου, τόσο κατά την εκτέλεση του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

Περίληψη

Ο καρκίνος του ήπατος είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι αποτελεσματικές καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αμπέλου έχουν αντικαρκινική δράση, αλλά τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονταν από τον καρπό του φυτού (κυρίως από σπόρους) ενώ λίγες είναι οι δεν υπάρχει σχετικά με την πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους. Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έχει δείχτει ότι εκχυλίσματα βόστρυχων έχουν αντιοξειδωτική, αντιμεταλλαξιγόνο, αντικαρκινική και αντι-αγγειογενετική δράση.

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασσύρτικο Σαντορίνης στη γονιδιακή έκφραση των ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η ανασταλτική δράση στην αύξηση αυτών των κυττάρων. Μάλιστα, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με το εκχύλισμα για δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, για 4 και 24 ώρες.

Αρχικά, υπολογίστηκε και το IC50 στην κυτταρική αύξηση μετά από 4 ώρες επώασης και βρέθηκε ότι ήταν 70 µg/ml, παραπλήσιο δηλαδή με το IC50 (80 µg/ml) μετά από 24 ώρες επώασης.

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επώαστηκαν για 4 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 296 γονίδια και υποεκφράστηκαν 151 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επώαστηκαν για 24 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 187 γονίδια και υποεκφράστηκαν 296 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη ήταν πολύ ενδιαφέροντα όσον αφορά την εύρεση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 καθώς βρέθηκαν πολλά και

σημαντικά γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται και συνδέονται με σημαντικές λειτουργίες των ηπατοκυττάρων αλλά και της καρκινογένεσης στο ήπαρ. Επίσης, ήταν πολύ ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων ανάμεσα στα πρώιμα και στα μεταγενέστερα στάδια της αναστολής της κυτταρικής αύξησης από το εκχύλισμα. Από τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν στις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *TAGLN*, *THBS1* και *KLF6*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *ID1*, *AURKA*, *TYMS*, *CEBPA*, *PAH*, *FOXAI*, *UBE2C* και *CCNA2*. Από τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν στις 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *LOC100133565*, *ITGA2*, *ANGPTL4* και *AKAP12*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στις 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *HAMP*, *ID1*, *GPAM*, *TOP2A* και *DKK1*.

ABSTRACT

Liver cancer is one of the most frequent cancer types exhibiting high death levels. Since the current therapies for liver cancer are not effective, new strategies such as chemoprevention and new compounds are needed for the fight against this cancer type.

Several studies from the Laboratory of Animal Physiology have shown that grape stem extracts have antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic and anti-angiogenic activity. Thus, the aim of the present study was to assess the effects of a grape stem extract from Assyrtiko Santorini variety on the whole gene expression in liver cancer cells HepG2 in order to investigate the molecular mechanisms through which this extracts inhibits HepG2 cell growth. The cells were treated with the extract for two different time points, 4 and 24 h.

Taking as a threshold the 2-fold difference in the over-expression or down-expression of the genes in HepG2 cells-treated for 4 h with the extract, it was shown that 296 genes were over-expressed and 151 genes were down-regulated compared to control cells. Moreover, taking as a threshold the 2-fold difference in the over-expression or down-expression of the genes in HepG2 cells-treated for 24 h with the extract, it was shown that 187 genes were over-expressed and 296 genes were down-regulated compared to control cells.

In conclusion, the results from the present study were very interesting as regards the investigation of the molecular mechanisms through which the grape stem extract inhibits HepG2 cell growth, since they were found many genes whose expression was altered and they are associated with important activities of liver cells as well as with liver carcinogenesis. Moreover, it was interesting that there were differences in the gene expression between 4 and 24 h of treatment. Among genes over-expressed after 4 h of treatment, the most important were *TAGLN*, *THBS1* and *KLF6*. Among genes down-expressed after 4 h of treatment, the most important were *ID1*, *AURKA*, *TYMS*, *CEBPA*, *PAH*, *FOXA1*, *UBE2C* and *CCNA2*. Among genes over-expressed after 24 h of treatment, the most important were *LOC100133565*, *ITGA2*, *ANGPTL4* and *AKAP12*. Among genes down-expressed after 24 h of treatment, the most important were *HAMP*, *ID1*, *GPAM*, *TOP2A* and *DKK1*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	7
Περιεχόμενα	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Καρκίνος	11
1.1. Γενικά	11
1.2 Καρκινογένεση	12
1.2.1. Γενικά	12
1.2.2. Παράγοντες καρκινογένεσης	15
1.2.3. Στάδια καρκινογένεσης - χαρακτηριστικά καρκινικού κυττάρου	16
1.3 Καρκίνος του ήπατος	18
2. Κύτταρα HepG 2	19
3. Χημειοπροφύλαξη	20
4 .Φαινολικές ενώσεις	22
4.1 Δομή – κατηγορίες φαινολικών ενώσεων	22
4.1.1 Φλαβονοειδή	22
4.1.2 Φαινολικά οξέα	24
4.1.3 Στυλβένια	25
4.1.4 Λιγνάνες	25
5. Σταφύλια	25
5.1 Κατανομή φαινολικών ενώσεων στα σταφύλια	28

5.2 Βιοδραστικότητα φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια	29
5.2.1 . Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες	29
5.2.2 . Καρδιοπροστατευτική δράση	31
5.2.3 . Αντικαρκινικές Ιδιότητες	32
5.2.4 . Αντιφλεγμομόδεις ιδιότητες	36
5.2.5 . Αντιγηραντικές ιδιότητες	37
5.2.6. Αντιμικροβιακή δράση	37
6. Σκοπος	40
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
1.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	41
1.1.2. Θρεπτικά υλικά	41
1.1.3. Εκχύλισμα	41
1.1.4. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2	42
1.1.5. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT	42
1.1.6. Απομόνωση RNA από τα κύτταρα HepG2 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από βόστρυχους αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης	44
1.1.7. Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης με ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays analysis) στα κύτταρα HepG2 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από βόστρυχους αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης	45

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

A. Εισαγωγή

1. Καρκίνος

1.1 Γενικά

Στην ιατρική ορολογία, ο Καρκίνος είναι η νόσος που προκαλείται από άναρχο και αφύσικο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων στους ιστούς του σώματος, που, συνακόλουθα, προκαλούν το σχηματισμό κακοήθων όγκων στον οργανισμό. Ουσιαστικά, ο καρκίνος αποτελεί κυτταρική νόσο.

Η ασθένεια αυτή έλαβε την επωνομασία της ήδη κατά τους αρχαίους χρόνους, οπότε και τη συναντούμε σε ιπποκρατικές πραγματείες καθώς και μεταγενέστερα ιατρικά κείμενα. Η άκρως ενδιαφέρουσα έρευνα γύρω από την ετυμολογία του όρου μας οδηγεί στην ινδοευρωπαϊκή ρίζα *kar – kar* που περιγράφει τη σκληρή επιφάνεια ενός αντικειμένου. Ένα παράγωγο της ρίζας αυτής χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ενός ζωικού οργανισμού με ιδιαίτερα σκληρό περίβλημα, του κάβουρα, ο οποίος στην αρχαιότητα ήταν γνωστός ως *καρκίνος*. Καθώς οι γιατροί της προχριστιανικής εποχής περιέγραφαν τους πρώτους υπό παρατήρηση καρκινικούς όγκους, τους παρομοίωσαν με τον κάβουρα, που χαρακτηρίζεται εμφανισιακά από μία κεντρική σωματική μάζα που απολήγει σε πολλαπλά άκρα. Γι' αυτό και ονόμασαν τους όγκους αυτούς *καρκίνους*.

Το 2006 στην Ευρώπη, διαγνώστηκαν 3.191.600 περιπτώσεις καρκίνου (εκτός των καρκίνων του δέρματος που δεν προέρχονται από μελάνωμα) ενώ 1.703.000 από αυτές οδήγησαν στο θάνατο. Οι πιο συχνές μορφές του καρκίνου ήταν ο καρκίνος του μαστού (429.900, 13.5% των καρκίνων), ακολουθούμενος από τον ορθοκολικό καρκίνο (412.900, 12.9%) και τον καρκίνο του πνεύμονα (386.300, 12.1%). Ο καρκίνος του πνεύμονα ο οποίος και εκτιμήθηκε ότι προκάλεσε 334.800 θανάτους (19.7% του συνόλου), ήταν η πιο συχνή αιτία θανάτου, ακολουθούμενος από τον ορθοκολικό (207.400), του μαστού (131.900) και του στομάχου (118.200) [Ferlay et al. 2007]. Ο συνολικός αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στην Ευρώπη φάνηκε να αυξήθηκε κατά 300.000 από το 2004 μέχρι το 2006. Με έναν εκτιμώμενο αριθμό 3.2 εκατομμυρίων περιπτώσεων (53% σε άντρες, 47% σε γυναίκες) και 1.7 εκατομμυρίων θανάτων (56% σε άντρες, 44% σε γυναίκες) κάθε χρόνο, ο καρκίνος εξακολουθεί να είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας στην

Ευρώπη και η γήρανση του πληθυσμού αναμένεται να οδηγήσει σε αύξηση των αριθμών.

1.2 Καρκινογένεση

1.2.1 Γενικά

Τα κύτταρα αποτελούν το κύριο δομικό στοιχείο κάθε οργανισμού. Στα αρχικά στάδια της ζωής του, ένας οργανισμός φροντίζει να πολλαπλασιάζει τα υπάρχοντα κύτταρά του και να σχηματίζει με τα νέα όλους τους απαραίτητους για τη λειτουργικότητά του ιστούς. Εύλογα, λοιπόν, παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή κυττάρων ως την ενηλικίωση ενός ανθρώπου, ενώ, στη συνέχεια, ο οργανισμός φροντίζει να παράγει νέα κύτταρα κυρίως για να αντικαθιστά φθαρμένους ιστούς ή για να επουλώνει τραυματισμούς. Ένας ανθρώπινος οργανισμός αναπτύσσεται βάσει συγκεκριμένων βιολογικών οδηγιών. Το σύνολο των οδηγιών αυτών είναι κωδικοποιημένο στο βιολογικό μακρομόριο που ονομάζεται *δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ*, γνωστό και από το αρκτικόλεξο **DNA**. Το DNA αποτελείται από μια αλυσίδα νουκλεοτιδίων (σύνθετων οργανικών μορίων) των οποίων η δομή και η θέση **καθορίζει** το πώς θα σχηματιστούν οι ιστοί του ανθρώπινου σώματος. Κάθε τμήμα αυτής της βιολογικής αλυσίδας που αφορά ένα συγκεκριμένο δομικό χαρακτηριστικό του οργανισμού ονομάζεται *γονίδιο*.

Το DNA μπορεί να υποστεί βλάβη, οπότε ένα ή περισσότερα από τα γονίδιά του αλλοιώνονται, με αποτέλεσμα, όταν και αν ενεργοποιηθούν, να προκαλούν μη φυσιολογικές, παθογόνους διεργασίες. Το πώς προκύπτουν οι βλάβες αυτές είναι ένα εξαιρετικής σημασίας ζήτημα. Αρκεί να αναφέρουμε πως περιβαλλοντικοί παράγοντες και συνήθειες, όπως το κάπνισμα, η διατροφή ή η υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία μπορούν να προκαλέσουν βλάβες αυτού του είδους. Ορισμένες, μάλιστα, από τις βλάβες αυτές μπορούν να κληροδοτηθούν και στους απογόνους ενός ανθρώπου.

Ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώσει εκάστοτε βλάβες αυτού του είδους, ή και να απορρίψει (καταστρέψει) παθολογικά κύτταρα, αλλά δεν επιτυγχάνει πάντοτε και σε πλήρη βαθμό σε αυτή του την αποστολή. Όταν ένα γονίδιο, λόγω βλάβης, προκαλεί τη γένεση καρκινικών κυττάρων και το σχηματισμό κακοήθων όγκων, τότε λέγεται πως έχει υποστεί εξαλλαγή, και έχει μετατραπεί σε ογκογονίδιο. Ο οργανισμός διαθέτει γονίδια ικανά να καταστείλουν τη δράση των ογκογονιδίων. Όταν, όμως, για κάποιο λόγο τα γονίδια αυτά – που

ονομάζονται καταστολείς ογκογονιδίων - δυσλειτουργούν, ή έχουν καταστραφεί ή αδρανοποιηθεί, τότε ξεκινά η διαδικασία της καρκινογένεσης. Το κύτταρο που περιέχει το ογκογονίδιο θα αρχίσει να δημιουργεί αντίγραφα του εαυτού του, τα οποία, με τη σειρά τους, θα συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, σχηματίζοντας κακοήγη όγκο που τροφοδοτείται από δικό του δίκτυο αιμοφόρων αγγείων. Τα κύτταρα αυτά είναι ουσιαστικά άχρηστα για τον οργανισμό, καθώς δεν αντικαθιστούν φθαρμένους ή κατεστραμμένους ιστούς. Όμως, εκτός από άχρηστα είναι και επιβλαβή.

Αξίζει να σημειωθεί πως η εμφάνιση καρκίνου είναι μια εξαιρετικά σύνθετη και περίπλοκη διαδικασία. Εκτός των γονιδιακών βλαβών (μεταλλάξεις, μεταθέσεις τμημάτων του DNA, απώλεια μέρους του DNA, απώλεια, βλάβη ή αδρανοποίηση των καταστολέων ογκογονιδίων) και των ογκογονιδίων, στη γένεση και την ανάπτυξη της νόσου θα παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες, η συνισταμένη των οποίων προκαλεί σταδιακά την καρκινογένεση. Δεν είναι τυχαίο πως ο καρκίνος προσβάλλει κυρίως ενήλικες ηλικίας 55 – 75 χρονών.

Έχουν προσδιοριστεί περισσότερες από διακόσιες παραλλαγές της νόσου, άλλα όλες χαρακτηρίζονται από δυσλειτουργική και ανεξέλεγκτη αύξηση ανώμαλων κυττάρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο καρκίνος δεν πρέπει να συγχέεται με το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τον οποίο προκαλεί το σώμα για να αναπλάσει κατεστραμμένους ή φθαρμένους ιστούς, ούτε με την *υπερπλασία*, κατά την οποία ο οργανισμός σχηματίζει φυσιολογικούς, λειτουργικούς ιστούς. Το σώμα πάσχει από καρκίνο όταν παθολόνα κύτταρα σχηματίζουν μία συγκεκριμένη κατηγορία όγκων.

Όγκος ονομάζεται μια κυτταρική συσσώματωση, δηλαδή μια συγκέντρωση κυττάρων που πολλαπλασιάστηκαν αφύσικα. Οι όγκοι διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Καλοήθεις όγκοι.

Οι όγκοι αυτοί σχηματίζονται από πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα εξαιτίας κάποιου ερεθισμού, φαινόμενο που ονομάζεται *καλοήθης νεοπλασία*. Ωστόσο, όταν ο ερεθισμός αυτός πάψει να υφίσταται, η νεοπλασία διακόπτεται, ο όγκος δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, δεν καταστρέφει περιβάλλοντες υγιείς ιστούς (μολονότι μπορεί να ασκήσει βλαπτική επίδραση πάνω τους) και δεν προκαλεί το σχηματισμό νέων όγκων σε άλλα σημεία του σώματος. Παράλληλα, όταν ένας καλοήθης όγκος αφαιρείται από την περιοχή του οργανισμού στην οποία αναπτύχθηκε, **δεν**

παρατηρείται εκ νέου ανάπτυξή του. Οι καλοήθεις όγκοι σπάνια προκαλούν σοβαρά προβλήματα σε έναν οργανισμό, και συνήθως αντιμετωπίζονται εύκολα.

2. Κακοήθεις όγκοι – Νεοπλάσματα.

Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται κακοήθεις είναι γνωστοί και ως *νεοπλάσματα*. Σχηματίζονται με τρόπο παρόμοιο με τους καλοήθεις όγκους, αλλά λειτουργούν εντελώς διαφορετικά. Τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα φέρουν μια παθογένεια που προκαλεί τη συνεχή και άναρχη αύξησή τους. Η *κακοήθης νεοπλασία* - η διαδικασία του άναρχου πολλαπλασιασμού των κυττάρων που καταλήγει σε σχηματισμό νέων ιστών εξακολουθεί να δρα, ακόμη και όταν ο αρχικός όγκος αφαιρεθεί από το σώμα, σχηματίζοντας στη θέση του ένα καινούργιο. Ταυτόχρονα, επιδρά καταστροφικά στους γεινιάζοντες ιστούς, στους οποίους εισβάλλει (διαδικασία που ονομάζεται *διήθηση*) και έχει τη δυνατότητα σχηματισμού νέων όγκων σε άλλα σημεία του σώματος, όταν καρκινικά κύτταρα, αφού αποσπαστούν από τον *πρωτογενή* όγκο, μετακινούνται μέσω του αίματος ή της λέμφου στο υπόλοιπο σώμα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *μετάσταση* (μετεγκατάσταση, δηλαδή, των καρκινικών κυττάρων). Οι κακοήθεις όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται, ανάλογα με το είδος τους, ως *καρκινώματα* ή *σαρκώματα*, είναι εν δυνάμει θανατηφόροι, ειδικά αν δεν διαγνωστούν έγκαιρα.

Όταν, λοιπόν, παρατηρείται σε έναν οργανισμό η ανάπτυξη παθολογικών κυττάρων που προκαλούν το σχηματισμό κακοήθων όγκων, τότε αναφερόμαστε σε αυτόν ως *καρκινοπαθή*. Μια επισήμανση, ωστόσο, είναι απαραίτητη: δεν σχηματίζουν όλα τα είδη καρκίνου όγκους. Περιώνυμο παράδειγμα η *λευχαιμία*, ένας τύπος καρκίνου του αίματος κατά τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα μετακινούνται διαρκώς στο σώμα μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος. Συνεπώς, βασικό κριτήριο για τη διάγνωση καρκίνου δεν είναι η ύπαρξη κακοήθων όγκων, αλλά το είδος της παθογένειας που προκαλεί το πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Όταν ανιχνεύεται ένας όγκος για πρώτη φορά, συνήθως περιέχει περισσότερα από ένα δισεκατομμύριο κύτταρα, μεταξύ των οποίων και πολλά φυσιολογικά. Διάφορες αναλύσεις που γίνονται, δείχνουν ότι οι καρκίνοι προέρχονται από ένα κύτταρο. Μελέτες έχουν δείξει ότι για να καταστεί ένα κύτταρο καρκινικό, θα πρέπει να υποστεί αρκετές μεταλλάξεις (έξι ή περισσότερες) στα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο. Ακόμη, θα πρέπει να μεταλλαχθούν γονίδια, που καθιστούν ικανά τα κύτταρα να διεισδύουν και να διασπείρονται (μετάσταση).

1.2.2 Παράγοντες καρκινογένεσης

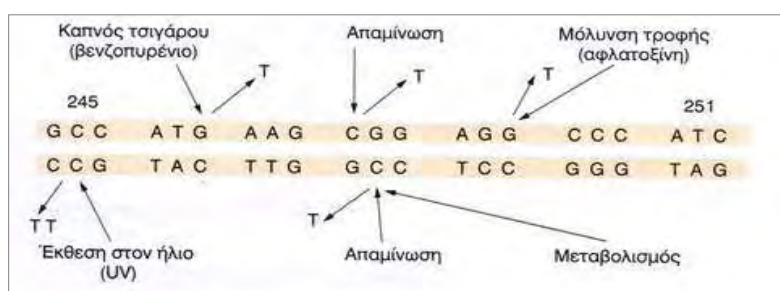
Με τον γενικό όρο **καρκινογένεση** εννοούμε την διαδικασία ανάπτυξης της νεοπλασίας. Πρόκειται για ένα ενεργό φαινόμενο το οποίο συνήθως προκαλείται από έναν ή περισσότερους καρκινογόνους παράγοντες-χημικούς, φυσικούς, βιολογικούς ή γενετικούς. Η παθητική καρκινογένεση ή η αυθόρμητη καρκινογένεση μπορεί να συμβεί στον οργανισμό χωρίς να έχει προηγηθεί εισαγωγή κάποιου παράγοντα καρκινογένεσης αλλά λόγω κάποιων ανωμαλιών του ίδιου του οργανισμού.

Η επικρατούσα άποψη για τον μηχανισμό με τον οποίο οι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η γήρανση του κυττάρου, καθώς και άλλες κυτταρικές διαδικασίες, επάγουν την καρκινογένεση είναι ότι αυξάνουν τις ελεύθερες ρίζες στο κύτταρο (οξειδωτικό στρες). Αυτές με τη σειρά τους δρουν στο DNA, προκαλώντας μόνιμες βλάβες. Όμως, το 1/4 περίπου των καρκίνων αναπτύσσεται σε άτομα γενετικώς υγιή, που ζουν σε περιβάλλον απαλλαγμένο από οποιοδήποτε καρκινογόνο, και αυτό γιατί ο ίδιος ο οργανισμός παράγει καρκινογόνα κατά τη μεταβολική διεργασία [Μαρμάρας και Λαμπροπούλου-Μαρμάρια, 2005].

Η σχέση ανάμεσα στον καρκίνο και στη γενετική προδιάθεση προτάθηκε το 1971 από τον Alfred Knudson ενώ αργότερα έγινε γνωστή και η κληρονομικότητα σε ορισμένους καρκίνους όπως του μαστού και του ήπατος [Missailidis, 2007]. Σήμερα, έχει αναγνωρισθεί μεγάλος αριθμός γονιδίων ο οποίος μπορεί να κληρονομηθεί και να συνεισφέρει στην υψηλή δεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Οι περιπτώσεις καρκίνου που οφείλονται στα παραπάνω γονίδια αποτελούν περίπου το 5% όλων των περιπτώσεων, με το υπόλοιπο να εξαρτάται από σωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου ενώ δεν μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά. Πιθανά αίτια είναι η επίδραση εξωτερικών παραγόντων ή ακόμα και η αυθόρμητη μετάλλαξη που λαμβάνει χώρα κατά την κυτταρική διαίρεση.

Τα γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση γενικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα ογκογονίδια και στα αντιογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Και οι δύο κατηγορίες γονιδίων απαντούν φυσιολογικά στα κύτταρα και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα περισσότερα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες («ενεργοποιημένες») μορφές φυσιολογικών γονιδίων, που καλούνται πρωτο-ογκογονίδια και ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Αν υποστούν τροποποίηση ή υπερεκφραστούν, είτε λόγω μετάλλαξης είτε λόγω μεταβολής κάποιου εξωτερικού ρυθμιστικού μηχανισμού, στο

κύτταρο στο οποίο θα συμβεί είναι δυνατόν να δημιουργηθούν συνθήκες ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού που θα το καταστήσουν κακόηθες. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δρουν παρεμποδίζοντας την ανώμαλη αύξηση. Η συνισταμένη των δύο αυτών διαδικασιών διατηρεί σε ισορροπία τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Όταν από κάποια αίτια τα γονίδια αυτά μεταλλαχθούν (Εικόνα 1), τότε καθίστανται υπεύθυνα για τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων [Μαρμάρας και Λαμπροπούλου-Μαρμάρα, 2005].



Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης καρκινογόνων. Απεικονίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία μιας περιοχής του γονιδίου p53 καθώς και μερικοί τύποι καρκινογόνων που προκαλούν συγκεκριμένες αλλαγές (Μαρμάρας και Λαμπροπούλου-Μαρμάρα 2005).

1.2.3 Στάδια καρκινογένεσης - χαρακτηριστικά καρκινικού κυττάρου

Η καρκινογένεση στους ανθρώπους είναι μια διαδικασία με πολλαπλά στάδια τα οποία αντανακλούν σε γενετικές αλλαγές, οδηγώντας τελικά στο μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήθη. Ο μετασχηματισμός αυτός χαρακτηρίζεται από τα κάτωθι, τα οποία και ισχύουν για τους περισσότερους αν όχι για όλους τους τύπους καρκίνου (Hanahan and Weinberg, 2000):

1. *Αυτο-επάρκεια σε αυξητικά σήματα.* Τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν μιτογόνα αυξητικά σήματα προκειμένου να μεταπέσουν από την ανενεργή κατάσταση στην ενεργή. Τα σήματα αυτά ενεργοποιούνται μέσω υποδοχέων οι οποίοι δεσμεύουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες, συστατικά του εξωκυττάρου χώρου και μόρια αλληλεπίδρασης/πρόσδεσης με το κύτταρο. Κανένας τύπος φυσιολογικού κυττάρου δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί εάν απουσιάζουν τα διεγερτικά αυτά σήματα. Πολλά ογκογονίδια μπορούν να μιμηθούν τη δράση των σηματοδοτικών αυξητικών παραγόντων.

2. *Μη-απόκριση σε ανασταλτικά σήματα.* Σε έναν φυσιολογικό ιστό, τα πολλαπλά σήματα κατά του πολλαπλασιασμού λειτουργούν για να διατηρήσουν την κυτταρική

ηρεμία και την ομοιόσταση των ιστών. Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν διαλυτούς αυξητικούς αναστολείς καθώς και αναστολείς ακινητοποιημένους στον εξωκυττάριο χώρο και στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων. Στο μοριακό επίπεδο, πολλά ή/και σχεδόν όλα τα σήματα κατά του πολλαπλασιασμού ρυθμίζονται από την πρωτεΐνη του γλοιώματος του αμφιβληστροειδούς (pRb). Διαταραχή στο μονοπάτι της παραπάνω πρωτεΐνης (υπερφωσφορυλίωσή της ή μετάλλαξη του γονιδίου της), η οποία έχει βρεθεί να συμβαίνει σε πολλούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου (Fynan and Reiss, 1993), απελευθερώνει μεταγραφικούς παράγοντες, επιτρέποντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3. *Αποφυγή της απόπτωσης.* Η ικανότητα των πληθυσμών των καρκινικών κυττάρων να εξαπλώνονται καθορίζεται όχι μόνο από τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά επίσης από τον ρυθμό της κυτταρικής φθοράς. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος – απόπτωση – αντανακλά την κύρια πηγή της φθοράς αυτής. *In vitro* και *in vivo* μελέτες αναφέρουν την ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων έναντι της απόπτωσης σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η ανθεκτικότητα αυτή αποκτάται από τα καρκινικά κύτταρα με ποικίλους τρόπους. Βεβαίως, ο πιο συχνός αφορά σε μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53.

4. *Απεριόριστη αντιγραφική ικανότητα.* Όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, οδηγούν στην αποσύζευξη της προγραμματισμένης κυτταρικής αύξησης από σήματα του περιβάλλοντος του κυττάρου. Εδώ και 30 χρόνια, έρευνες δείχνουν ότι η διαταραχή στην επικοινωνία των κυττάρων δεν είναι επαρκής για να διευκολύνει την εξάπλωση του όγκου. Πολλοί και ίσως όλοι οι τύποι των κυττάρων των θηλαστικών φέρουν ένα εσωτερικό αυτόνομο πρόγραμμα, το οποίο περιορίζει τον πολλαπλασιασμό τους. Το πρόγραμμα αυτό δείχνει να δρα ανεξάρτητα από τα μονοπάτια σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων ενώ θα πρέπει να αποσυντονιστεί για να μπορέσουν τα κύτταρα να εξαπλωθούν και να δημιουργήσουν τον μακροσκοπικό όγκο.

5. *Αγγειογένεση.* Οι όγκοι εμφανίζονται να ενεργοποιούν την αγγειογένεση αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ των αγγειογενετικών επαγωγέων και των αναστολέων (Hanahan and Folkman, 1996). Σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει βρεθεί επαγωγή του VEGF ή/και των FGFs ενώ άλλοι υποεκφράζουν τους ενδογενείς αναστολείς, όπως η θρομβοσπονδίνη-1 και η β- ιντερφερόνη.

6. *Διήθηση και μετάσταση.* Οι πρωταρχικοί όγκοι, αργά ή γρήγορα, μεταναστεύουν στους γειτονικούς ιστούς και από εκεί σε απομακρυσμένα μέρη. Σχηματίζονται έτσι νέες αποικίες σε μέρη του σώματος όπου, τουλάχιστον αρχικά, δεν υπάρχει

περιορισμός σε θρεπτικά συστατικά και σε χώρο. Έχει αποδειχθεί ότι όλα τα παραπάνω γίνονται είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω αλλαγών στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων.

1.3 Καρκίνος του ήπατος

Όταν ο αρχικός κακοήθης όγκος αναπτύσσεται σε κάποιο μέρος του ήπατος, ονομάζεται ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ή κακοήθες ηπάτωμα ή πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος και, εάν ο όγκος στο ήπαρ προέρχεται από μεταστάσεις καρκίνου από άλλα όργανα, όπως από το παχύ έντερο, στομάχι κ.λπ., ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος του ήπατος. Στα παιδιά παρουσιάζεται ένας άλλος τύπος καρκίνου του ήπατος, το ηπατοβλάστωμα. Ο καρκίνος του ήπατος είναι ο πέμπτος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως. Είναι ταυτόχρονα η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτων λόγω καρκίνου (Parkin et al, 2001). Στην Ελλάδα παρουσιάζει μέτρια συχνότητα αλλά αυτή φαίνεται να είναι μεγαλύτερη, συγκρινόμενη με εκείνη της Δυτικής και της Βόρειας Ευρώπης. Σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου, θα πρέπει να τονιστεί ότι βρίσκεται σε στενή σχέση με τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και της ηπατίτιδας C (HCV) (Bosch et al, 1999; Pang et al 2006), δοθέντος ότι περίπου το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του ήπατος σχετίζεται με HBV και το 10% με HCV. Υπολογίζεται ακόμη ότι το 10-20% των ασθενών με λοίμωξη από HBV θα αναπτύξουν στη ζωή τους καρκίνο του ήπατος. Η ακριβής σχέση μεταξύ HCV λοίμωξης και καρκίνου του ήπατος σήμερα ακόμη μελετάται.

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι ορισμένες παθήσεις του ήπατος, όπως η κίρρωση (προοδευτικά εξελισσόμενη χρόνια νόσος του ήπατος), παρουσιάζουν συχνότερα ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος. Τούτο μάλιστα φαίνεται ότι ισχύει για την κίρρωση οποιασδήποτε αιτιολογίας, όπως όταν αυτή αποτελεί επακόλουθο του αλκοολισμού, αιμοχρωμάτωσης, κακής θρέψης κ.λπ. (Pang et al, 2006). Ακόμη, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αφλατοξίνες, μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος. Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες που παράγονται από είδη του γένους *Aspergillus*, και βρίσκονται σε ορισμένες τροφές, όπως τα καρύδια και το καλαμπόκι,

ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Σε περιοχές όπου η κατανάλωση τροφών που περιέχουν αφλατοξίνες είναι συνηθισμένη, η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του ήπατος τείνει να είναι υψηλή (Nordenstedt et al.,2010)

Συνοπτικά οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο προσβολής από καρκίνο του ήπατος είναι:

1. **Ηπατίτιδες:** Οι χρόνιες μολύνσεις του ήπατος από τους ιούς που προκαλούν ηπατίτιδα Β και C, είναι σε θέση να προκαλούν καρκίνο του ήπατος. Σε αριθμό ασθενών με τις εν λόγω ηπατίτιδες, αναπτύσσεται καρκίνος ήπατος μετά από πολλά χρόνια μόλυνσης
2. **Κίρρωση του ήπατος:** Στην κίρρωση τα ηπατοκύτταρα καταστρέφονται και αντικαθίστανται από ινώδη ιστό. Περίπου 5% των ασθενών με κίρρωση, παρουσιάζουν καρκίνο ήπατος. Η κίρρωση δυνατόν να προκληθεί από κατάχρηση αλκοόλ, ιούς, φάρμακα, χημικές ουσίες, παράσιτα. Η αιτία της κίρρωσης παραμένει άγνωστη
3. **Αφλατοξίνη:** Πρόκειται για τοξίνη που προκαλεί καρκίνο ήπατος. Η αφλατοξίνη δημιουργείται στη μούχλα που σχηματίζεται σε ξηρούς καρπούς και δημητριακά
4. **Το άρρεν φύλο:** Οι άνδρες παρουσιάζουν με μεγαλύτερη συχνότητα στη νόσο από ότι οι γυναίκες
5. **Οικογενειακό ιστορικό:** Άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του ήπατος έχουν περισσότερες πιθανότητες να προσβληθούν από τη νόσο
6. **Ηλικία:** Στους ηλικιωμένους άνω των 60 ετών, η νόσος είναι συχνότερη

Ο καρκίνος του ήπατος, στα αρχικά του στάδια δεν προκαλεί συμπτώματα. Εξελίσσεται χωρίς να γίνεται αντιληπτός. Σταδιακά εμφανίζονται διάφορα συμπτώματα όπως:

1. Πόνος στο άνω και δεξιό μέρος της κοιλιάς. Ο πόνος μπορεί να αντανακλάται στην πλάτη και στον ώμο
2. Πρήξιμο της κοιλιάς, αύξηση μεγέθους του ήπατος (ηπατομεγαλία) ή ακόμη ψηλάφηση όγκου στην περιοχή του ήπατος
3. Απώλεια βάρους
4. Ανορεξία και αίσθημα πληρότητας
5. Επίμονη, έντονη κούραση
6. Αδυναμία
7. Αναγούλες και εμετοί
8. Ίκτερος: Κίτρινη χροιά δέρματος, ματιών και ούρα πολύ σκούρου χρώματος
9. Πυρετός

2. Κύτταρα HepG 2

Τα κύτταρα HepG 2 είναι μια κυτταρική σειρά η οποία προέρχεται από ιστό ήπατος με ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα είναι επιθηλιακά στην μορφολογία τους, και δεν είναι ογκογονικά, ενώ εκκρίνουν αρκετές από τις κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη,

ινωδογόνο, άλφα2-μακροσφαιρίνη, άλφα1-αντιθρυψίνη, τρανσφερίνη και πλασμινογόνο. Έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς σε μεγάλης κλίμακας συστήματα καλλιέργειας. Αντιγόνα του ιού της ηπατίτιδας Β δεν έχουν εντοπιστεί και ανταποκρίνονται σε διέγερση με την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.

Τα κύτταρα HepG2 είναι κατάλληλα για ένα *in vitro* μοντελοποιημένο σύστημα για τη μελέτη των πολωμένου ανθρώπινων ηπατοκυττάρων. Με τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα HepG2 εμφανίζουν ισχυρή μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση (van IJzendoorn et al., 1997), που μοιάζουν με αυτά των περιοχών της καναλιοειδής και ημιτονοειδείς χολής. Λόγω του υψηλού βαθμού της μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και δυναμικής των μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων της καναλιοειδούς και ημιτονοειδούς χολής στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Αυτό μπορεί να είναι σημαντικό για η μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών του ήπατος που προκαλούνται από εσφαλμένη υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, π.χ. σύνδρομο Dubin Johnson, η προϊούσα συγγενής ενδοηπατική χολόσταση και η συγγενής υπερχοληστερολαιμία. Τα κύτταρα αυτά και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται επίσης για μελέτες του μεταβολισμού και της τοξικότητας των ξеноβιοτικών ουσιών στο ήπαρ, την ανίχνευση των περιβαλλοντικών και διατροφικών κυτταροτοξικών και γενοτοξικών παραγόντων, την κατανόηση της ηπατοκαρκινογένεσης, και για μελέτες που εξετάζουν ναρκωτικές ουσίες (Mersch-Sundermann et al, 2004). Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται επίσης σε δοκιμές με βιο-συσκευές τεχνητού ήπατος

3. Χημειοπροφύλαξη

Χημειοπροφύλαξη κατά του καρκίνου είναι η χρήση φυσικών, συνθετικών χημικών (γίνονται σε ένα εργαστήριο) ή βιολογικών (από μία ζωντανή πηγή) ουσιών για την αντιστροφή, καταστολή ή την πρόληψη της ανάπτυξης του καρκίνου (Sporn and Liby, 2005). Αυτό γίνεται με την λήψη φαρμάκων, βιταμινών ή άλλων παραγόντων, ενώ πολλά χημειοπροστατευτικά είναι φυτοχημικά δηλαδή μη θρεπτικές χημικές ουσίες των φυτών που έχουν προστατευτικές ή προληπτικές ιδιότητες κατά των ασθενειών.

Η Χημειοπροφύλαξη χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες:

α) Στρατηγικές πρωτογενούς πρόληψης με στόχο την αποφυγή κακοηθειών (καρκίνοι), σε έναν κατά τα άλλα υγιή πληθυσμό. Αυτά τα άτομα μπορούν να έχουν ένα ιστορικό που τους βάζει σε μεγαλύτερο κίνδυνο, όπως ένα ιστορικό καπνίσματος ή ιδιαίτερες γενετικές μεταλλάξεις που τους προδιαθέτουν στην ανάπτυξη του καρκίνου.

β) Η δευτερογενής πρόληψη περιλαμβάνει ασθενείς που έχουν γνωστές προκαρκινικές βλάβες που χρησιμοποιούν φάρμακα ή βιταμίνες σε μια προσπάθεια να αποτρέψουν την εξέλιξη αυτών των αλλοιώσεων σε καρκίνο.

γ) Η τριτογενής πρόληψη εστιάζει στην πρόληψη νέων κρουσμάτων καρκίνου σε ασθενείς που θεραπεύτηκαν από έναν αρχικό καρκίνο ή για άτομα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για προκαρκινικές αλλοιώσεις. Οι κλινικές δοκιμές της χημειοπροφύλαξης βασίζονται στην ιδέα ότι η διακοπή των βιολογικών διαδικασιών που εμπλέκονται στην καρκινογένεση (η διαδικασία της μετατροπής των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα), θα αναστέλλουν αυτήν τη διαδικασία και, με τη σειρά τους, θα μειώσουν την συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου.

Ο ιδανικός χημειοπροληπτικός παράγοντας δεν θα μεταβάλει σημαντικά την ποιότητα της ζωής, είναι φθηνός, ασφαλής, ικανοποιητικά ανεκτός από τον οργανισμό και αποτελεσματικός. Ωστόσο, ορισμένα χημειοπροληπτικά φάρμακα μπορεί να έχουν σοβαρές παρενέργειες σε ορισμένους ασθενείς, το οποίο είναι ένα ζήτημα κατά την εξέταση μακροχρόνιας χορήγησης μιας ουσίας σε υγιείς ανθρώπους οι οποίοι μπορεί ή να μην μπορεί να αναπτύξουν καρκίνο.

Μερικά παραδείγματα χημειοπροφύλαξης είναι :

α) Tamoxifen (Nolvadex) , ουσία-φραγμός των οιστρογόνων που μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού , καθώς και η ραλοξιφαίνη (Evista) , η οποία μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που έχουν περάσει την εμμηνόπαυση .

β) Finasteride (Propecia , Proscar) και παρόμοια φάρμακα που μειώνουν τον κίνδυνο καρκίνου του προστάτη με τη μείωση του ποσού της διυδροτεστοστερόνης (μιας ανδρική ορμόνη) που παράγεται από τον οργανισμό .

γ) Η ασπιρίνη και άλλα μη-στεροειδή αντι - φλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) χρησιμοποιούνται για να μειώσουν τον κίνδυνο πολλών τύπων καρκίνου σε άτομα που βρίσκονται στον μέσο όρο επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου .

4 .Πολυφαινολικές ενώσεις

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον από ερευνητές και βιομηχανίες τροφίμων για τις πολυφαινολικές ενώσεις. Το αυξημένο αυτό ενδιαφέρον προέκυψε από την αφθονία τους στα τρόφιμα (Shahidi F. and Naczki M. 1995), την αναγνώριση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους και τον πιθανό τους ρόλο στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Middleton E et al, 2000).

4.1 Δομή – κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές χιλιάδες πολυφαινολικών ενώσεων οι οποίες βρίσκονται στα ανώτερα φυτά καθώς και στα εδάφιμα τμήματά τους (Manach et al, 2004).

Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν δευτερεύοντες μεταβολίτες των φυτών και αποτελούν μέρος των αμυντικών τους μηχανισμών έναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, την αυξημένη θερμοκρασία και τους παθογόνους μικροοργανισμών (Robbins, 2003).

Η δομή αυτών των μορίων ποικίλει και έτσι μπορούμε να συναντήσουμε πολυφαινολικές ενώσεις με έναν ανθρακικό σκελετό με έξι άτομα άνθρακα όπως είναι τα φαινολικά οξέα, μέχρι σύνθετες πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούμενες από πολυμερισμένα μόρια όπως είναι οι ταννίνες.

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, στους οποίους είναι συνδεδεμένες μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίων και ανάλογα με την δομή του ανθρακικού σκελετού διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή (Manach et al, 2004).

4.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων. Αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία πολυφαινολών με δομή C6-C3-C6. Ανάλογα με τον βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου, χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

α) τις φλαβονόλες (κερκετίνη, ρουτίνη, καμπερόλη, μυρικετίνη, κ.α.)

- β) τις φλαβόνες (απιγενίνη, λουτεολίνη κ.α.)
- γ) τις ισοφλαβόνες (γενιστεΐνη, δαϊντζεΐνη κ.α.)
- δ) τις φλαβανόνες (ναριγενίνη, εσπεριτίνη κ.α.)
- ε) τις ανθοκυανιδίνες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη, μαλβιδίνη κ.α.)

στ) τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη κ.α.). Τα φλαβονοειδή είναι δυνατόν να πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Από έναν τέτοιο πολυμερισμό των φλαβανολών με τους γαλλικούς εστέρες τους προκύπτει μια σημαντική κατηγορία πολυμερών οι προανθοκυανιδίνες. Είναι δυνατή επίσης η αντίδραση σακχάρων όπως η γαλακτόζη, η αραβινόζη, η L-ραμνόζη, D-γλυκόζη με διάφορα φλαβονοειδή προς σχηματισμό γλυκοσυλιωμένων μορφών (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Cook και Samman 1996).

Οι κυριότερες πηγές φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, τα λάχανα, τα πράσσια, τα μπρόκολα και τα βατόμουρα (έως 1,2g/ Kg). Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν επίσης φλαβονόλες (μέχρι 45mg/ lt). Τα φρούτα περιέχουν επίσης 5 μέχρι 10 είδη γλυκοζιτών των φλαβονολών (Macheix et al,1990). Οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στις επιφάνειες των εξωτερικών ιστών (φλοιός, φύλλα) καθώς η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από το φως. Λόγω της διαφορετικής έκθεσης στο φως παρατηρούνται διαφορές στην περιεκτικότητα σε φλαβονόλες και σε γλυκοζίτες των φλαβονολών στα φρούτα του ίδιου δέντρου (Price et al, 1995) και στα εξωτερικά και εσωτερικά φύλλα των φυλλωδών λαχανικών (λάχανα, μαρούλια)(Hettmann, 1976) αντίστοιχα.

Οι φλαβόνες που είναι λιγότερο συχνές από τις φλαβονόλες περιέχονται στο σέλινο, τον μαϊντανό και το πιπέρι (κοκκινοπίπερο ενώ τα δημητριακά περιέχουν C-γλυκοζίτες των φλαβονών (King, 1962).

Οι φλαβανόνες λαμβάνονται με το καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου και βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και στα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, λεμόνια, γκρέιπ-φρουτ). Ένα ποτήρι χυμό πορτοκάλι περιέχει 200-600mg εσπεριδίνης (Tomas-Barberan and Clifford 2000).

Οι ισοφλαβόνες είναι τα φλαβονοειδή με δομικές ομοιότητες που προσεγγίζουν τα οιστρογόνα, χωρίς όμως να είναι στεροειδή και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα (Cassidy et al., 2000). Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια, στη σόγια (και τα επεξεργασμένα παράγωγά της) καθώς

και στους ξηρούς καρπούς). Η σόγια περιέχει περίπου 1mg γκενιστεΐνης, ντεζντεΐνης και γλυκιτεΐνης σε αναλογία 1:1:0,2 (Coward et al, 1998).

Τις φλαβανόλες, τις συναντάμε είτε στην μονομερή (κατεχίνες) είτε στην πολυμερή τους μορφή (προανθοκυανιδίνες). Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά φρούτα όπως κεράσια, βερίκοκα, σταφύλια, αχλάδια και μήλα. Επίσης τις βρίσκουμε στο κόκκινο κρασί (270mg/L), στο πράσινο τσάι (100-800mg/L) και την σοκολάτα (460-610mg/50g) (Lakenbrink et al., 2000).

Οι προανθοκυανιδίνες μπορεί να είναι διμερή, ολιγομερή ή και πολυμερή των κατεχινών. Η στυπτικότητα των τροφίμων οφείλεται στην ανάπτυξη πολύπλοκων συμπλεγμάτων με τις πρωτεΐνες του σάλιου. Βρίσκονται κυρίως σε φρούτα όπως σταφύλια, ροδάκινα, μήλα, αχλάδια και μούρα (Clifford, 2000) αλλά και στο κρασί, το τσάι, την μπίρα και τη σοκολάτα (Santos-Buelga and Scalbert, 2000).

Οι ανθοκυανιδίνες αποτελούν χρωστικές που προσδίδουν κόκκινο, ροζ, μπλε ή και ερυθροκυανό χρώμα. Στο διαιτολόγιο του ανθρώπου βρίσκονται συχνά στα φρούτα, στο κόκκινο κρασί, στα δημητριακά και τα φυλλώδη λαχανικά. Η κυανιδίνη είναι η συχνότερα συναντώμενη ανθοκυανίνη.

4.1.2 Φαινολικά οξέα

Αποτελούν την δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται στα ραπανάκια, στα κρεμμύδια καθώς και στο τσάι, ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται συχνά στα τρόφιμα και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φεουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκιναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ. Ένα φλιτζάνι στιγμιαίου καφέ περιέχει 70-350mg χλωρογενικού οξέος (Clifford 1999). Τα είδη των φρούτων που περιέχουν τις μεγαλύτερες ποσότητες παραγώγων του υδροξυκιναμικού οξέος είναι τα βατόμουρα, τα δαμάσκηνα, τα ακτινίδια, τα μήλα και τα κεράσια τα

οποία περιέχουν 0,2-2,0 g παραγώγων του υδροξυκινναμωνικού οξέος/ kg (Macheix et al., 1990). Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των σπόρων δημητριακών, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής τους από τον άνθρωπο (Lempereur et al., 1997). Συγκεκριμένα η ποσότητα φερουλικού οξέος του κόκκου σιταριού είναι 0,8-2,0 g/kg ξηρού βάρους, το οποίο μπορεί να συνεισφέρει μέχρι και στο 90% της συνολικής ημερήσιας προσλαμβανόμενης ποσότητας φαινολικών οξέων.

4.1.3 Στιλβένια

Τα στιλβένια απαντώνται σε μικρές ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Το πιο κοινό μέλος τους είναι η trans-ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου. Βρίσκεται κυρίως στον φλοιό των κόκκινων ποικιλιών σταφυλιού (1,5-7,3mg/g)(18) και το κρασί (0,3-0,7mg/l)(17-19)(Bertelli et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997).

4.1.4 Λιγνάνες

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Τα λιγνάνια αν και έχουν απομονωθεί από το ανθρώπινο πλάσμα και ούρα, στα τρόφιμα τα συναντάμε σε μικρά ποσοστά. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος καθώς και το λάδι του, ενώ άλλα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν ίχνη από λιγνάνια (Adlercreutz και Mazur 1997).

5. Σταφύλια

Το πρωταρχικώς καλλιεργούμενο είδος σταφυλιών , *Vitis vinifera* , είναι ένα από τα περίπου 60 είδη του γένους *Vitis* . Είδη του γένους είναι ενδημικά στις εύκρατες περιοχές του βορείου ημισφαιρίου , με μερικά είδη να φθάνουν ως τους τροπικούς . Στη Βόρεια Αμερική , υπάρχουν περίπου εικοσιτέσσερα είδη . Κάποια είδη συναντώνται στην Ασία , αλλά μόνο ένα είναι ιθαγενές στην Ευρώπη , το *Vitis vinifera* . Το *Vitis vinifera* είναι μακράν τα πιο σημαντικό οικονομικά φυτό των ειδών *Vitis* και σε αυτό ανήκουν οι περισσότερες καλλιεργούμενες εμπορικές φυτείες αμπέλου. Σχεδόν τα τρία τέταρτα της εμπορικής παραγωγής σταφυλιών στον κόσμο,

είναι αφιερωμένη σε οινοποιήσιμα σταφύλια ενώ περίπου το ένα τέταρτο για τα επιτραπέζια και πολύ μικρότερα ποσά στα αποξηραμένα σταφύλια (σταφίδες) .

Το *Vitis vinifera* είναι ένα σθεναρό αναρριχώμενο φυτό που μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 16 έως 20 m , αν αφεθεί ακλάδευτο. Τα φύλλα του είναι παλαμοειδή με πλάτος 9-28 cm και τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα (βοτρυώδεις ταξιανθίες).

Η αλληλουχία του γονιδιώματος του *Vitis Vinifera* είναι πλήρως προσδιορισμένη, και αποτελεί το τέταρτο είδος αγγειοσπέρμων του οποίου το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχιθεί. Τον Μάρτιο του 2007 , επιστήμονες από την Australia's Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), εργαζόμενοι για το Cooperative Research Centre for Viticulture ανέφεραν ότι «η έρευνά τους δείχνει ότι εξαιρετικά σπάνιες και ανεξάρτητες μεταλλάξεις σε δύο γονίδια (*VvMYBA1* και *VvMYBA2* των κόκκινων σταφυλιών) παρήγαγαν ένα λευκό σταφύλι που αποτέλεσε το μητρικό φυτό για όλες σχεδόν τις ποικιλίες λευκού σταφυλιού που καλλιεργούνται σήμερα παγκοσμίως. Εάν μόνο ένα γονίδιο είχε μεταλλαχθεί , τα περισσότερα σταφύλια θα εξακολουθούσαν να είναι κόκκινα και δεν θα είχαμε τις πάνω από 3000 ποικιλίες λευκών σταφυλιών που είναι διαθέσιμες σήμερα (Walker AR et al., 2007). Το συγκομιζόμενο τμήμα του αμπελιού αποτελεί ο βότρυς (σταφύλι) ο οποίος αποτελείται από δύο κύρια μέρη:

A) το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχος ή τσαμπί

B) τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού

Τα σταφύλια αποτελούνται από 80% νερό και περιέχουν 70 θερμίδες ανά 100 g, με περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες περίπου 16%. Οι χυμοί σταφυλιών του εμπορίου έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σακχαρόζη από ότι άλλοι χυμοί φρούτων (Yoon JH et al., 1997), ενώ και άλλα σάκχαρα, αμινοξέα και οργανικά οξέα έχουν εντοπιστεί και στο χυμό σταφυλιών και στα κρασιά (Linget et al., 1998). Το αμινοξύ αργινίνη είναι πλούσιο στο χυμό σταφυλιών (Austin and Butzke, 2000). Τα σταφύλια περιέχουν τρυγικό και καρβοξυλικά οξέα, συμπεριλαμβανομένων του μηλικού, κιτρικού, γαλακτικού και ηλεκτρικού οξέως (Ensminger ME, Ensminger AH, 1994; Fuleki T., 1993). Οι βιταμίνες A, B₁, B₂, και C είναι επίσης παρούσες στα σταφύλια, όπως και διάφορα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένων του χρωμίου και του καλίου (Koswig S and Hofsommer HJ., 1995; Mazza G., 1995)(Πίνακας 1.)

Μέση διατροφική ανάλυση 100g σταφυλιού		
Θρεπτικό συστατικό	Τιμή	% της ΣΗΠ*
Ενέργεια	100 Kcal	5,0%
Υδατάνθρακες	18 g	14%
Πρωτεΐνες	0.72 g	1%
Ολικά λιπαρά	0.16 g	0.5%
Διαιτητικές ίνες	0.9 g	2%
Βιταμίνες		
Φυλλικό οξύ	2 µg	0.5%
Νιασίνη	0.188 mg	1%
Παντοθενικό οξύ	0.050 mg	1%
Πυριδοξίνη	0.086 mg	7.5%
Ριβοφλαβίνη	0.070 mg	5%
Θειαμίνη	0.069 mg	6%
Βιταμίνη Α	66 IU	3%
Βιταμίνη C	10.8 mg	18%
Βιταμίνη E	0.19 mg	1%
Βιταμίνη K	14.6 µg	12%
Ηλεκτρολύτες		
Νάτριο	0%	1 mg
Κάλιο	191 mg	4%
Μέταλλα		
Ασβέστιο	10 mg	1%
Χαλκός	0.127 mg	14%
Σίδηρος	0.36 mg	4.5%
Μαγνήσιο	7 mg	2%
Μαγγάνιο	0.071 mg	3%
Ψευδάργυρος	0.07 mg	0.5%
Φυτοχημικά		
α-Καροτένιο	1 µg	--
β-καροτένιο	39 µg	--
Λουτεΐνη-ζεαξανθίνη	72 µg	--

*ΣΗΠ: Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη
 Πηγή : USDA National Nutrient data base

(Πίνακας 1)

Εκτός των ανωτέρω στα σταφύλια και το κρασί περιέχονται εδώδιμες ίνες και φυτοχημικές ενώσεις. Ο όρος βιοδραστικές ή φυτοχημικές ενώσεις αναφέρεται σε ουσίες φυτικής προέλευσης που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν ιδιότητες που τους προσδίδουν την ικανότητα να δρουν προστατευτικά σε χρόνιες παθήσεις (Bidlack et al., 2000). Οι πολυφαινόλες είναι τα πιο σημαντικά φυτοχημικά που βρίσκονται στα σταφύλια, επειδή έχουν πολλές βιολογικές ιδιότητες και προάγουν οφέλη για την υγεία (Shrikhande AJ., 2000; Silva RC et al 1991; Wada M., 2007). Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν κυρίως τις ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή, τις φλαβονόλες, τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φαινολικά οξέα (Dopico-Garcia

MS. et al., 2008; Novaka I. et al., 2008; Spacil Z. et al., 2008). Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες, και υπάρχουν κυρίως στην φλούδα των σταφυλιών. Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στα σταφύλια, ιδιαίτερα στους σπόρους και τα στελέχη τα οποία περιέχουν κυρίως κατεχίνες, επικατεχίνες και πολυμερή προκυανιδίνης. Οι ανθοκυανίνες είναι άφθονες στα κόκκινα σταφύλια, ενώ οι λευκές ποικιλίες πλούσιες σε φλαβάν-3-όλες (Chacona MR. et al., 2009; Bagchi D. et al., 2000; Cantos E. et al., 2002).

Από το φαινόμενο του «γαλλικού παράδοξου»(όπου οι Γάλλοι παρά την μεγάλη κατανάλωση λιπαρών τροφών έχουν χαμηλά ποσοστά καρδιαγγειακών νοσημάτων), οι πολυφαινόλες από τα σταφύλια και το κόκκινο κρασί προσέλκυσαν την προσοχή των επιστημόνων ώστε να καθορίσουν την χημική τους σύσταση και τις επιδράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου [Urpi-Sarda M. Et al., 2009]. Οι αναφερόμενες αποδείξεις για τις ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνουν αναστολή κάποιων εκφυλιστικών ασθενειών, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα [Shanmuganayagam D. et al., 2007; Olas B. et al., 2008; Falchi M. et al., 2006; Tsanga C. et al., 2005), ορισμένες μορφές καρκίνου (God JM. et al., 2007; Singletary KW, et al., 2003; Jung K. et al., 2006), η μείωση του οξειδωτικού stress του πλάσματος και η επιβράδυνση της γήρανσης (Meyer AS. et al., 1997; Sato M. et al., 1996). Οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται επίσης ως συντηρητικά κατά των μικροβίων και την οξείδωση των τροφίμων (Rodriguez-Vaquero MJ. et al., 2007; Rhodes PL. et al., 2006). Επιπλέον, σε δοκιμές in vivo φάνηκε ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι βιοδιαθέσιμες (Urpi-Sarda M. et al., 2009; Hurrell RF. et al., 1999). Ως εκ τούτου, εκτός από το κρασί και το χυμό, και συμπληρώματα διατροφής με βάση το σταφύλι θα μπορούσαν να είναι πολλά υποσχόμενα λειτουργικά τρόφιμα.

5.1 Κατανομή φαινολικών ενώσεων στα σταφύλια

Το σταφύλι είναι ένα πλούσιο σε φαινόλες φυτό, και αυτές κατανέμονται κυρίως στον φλοιό, τον βλαστό, τα φύλλα και τους σπόρους του σταφυλιού, παρά στην χυμώδη σάρκα του (Pastrana-Bonilla E. et al., 2003; Makris DP. et al., 2008). Η συνολική περιεκτικότητα φαινολικών ουσιών στις φλούδες των σταφυλιών ποικίλη ανάλογα με την ποικιλία, την σύνθεση του εδάφους, το κλίμα, την γεωγραφική θέση, τις πρακτικές της καλλιέργειας ή την έκθεση σε ασθένειες, όπως μυκητιάσεις (Bruno

and Sparapano, 2007). Οι ενώσεις που κυρίως περιέχονται είναι προανθοκυανιδίνες , ανθοκυανίνες , φλαβονόλες , φλαβανόλες , ρεσβερατρόλη και φαινολικά οξέα (Dopico-Garcia MS. et al., 2008; Novaka I. et al., 2008; Mazza GJ, 2007; Hernandez-Jimenez A. et al., 2009). Οι προανθοκυανιδίνες είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις στους σπόρους και τον φλοιό των σταφυλιών (Hernandez-Jimenez A. et al., 2009). Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και φρούτων, ενώ η σάρκα δεν περιέχει καθόλου ανθοκυανίνες (Dopico-Garcia MS. et al., 2008; Falchi M. et al., 2006). Στο κόκκινο κρασί , περιέχονται κυρίως ανθοκυανίνες και φλαβονοειδή ενώ η κατεχίνη είναι το πιο άφθονο φλαβονοειδές (Bell JRC. et al., 2000).

5.2. Βιοδραστικότητα φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από τα σταφύλια έχει επικεντρωθεί στις βιολογικές δράσεις τους, που συνδέονται με τα ωφέλη για την ανθρώπινη υγεία, όπως αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές , αντικαρκινικές , αντιφλεγμονώδεις , αντιγηραντικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες .

5.2.1 . Αντιοξειδωτικές Ιδιότητες

Είναι η πιο αξιοσημείωτη βιοδραστική ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια, καθώς συμμετέχουν στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών, την αναστολή της οξειδωσης των λιπιδίων, και την μείωση σχηματισμού υδροϋπεροξειδίου. Αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση προκύπτει για το κρασί και το χυμό σταφυλιού ενώ από τα διάφορα μέρη των σταφυλιών η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα βρέθηκε στους σπόρους σταφυλιού , ακολουθούμενη από τον φλοιό ενώ η σάρκα εμφανίζει την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Pastrana-Bonilla E. et al., 2003).

Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να ανακαλύψουν ποιές φαινολικές ενώσεις και χημική δομή (ες) είναι κυρίως υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του εκχυλίσματος σταφυλιών. Για τις ίδιες φαινολικές ενώσεις, συγκεντρώσεις 50% και 25% (v / v) έδειξαν τις ίδιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ και οι δύο είναι καλύτερες από εκείνη της συγκέντρωσης 10% (v / v). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ίσως η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών έχει ένα όριο κορεσμού στην συγκέντρωση, και πάνω από αυτό το όριο, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα δεν μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με τη συγκέντρωση (Dani C. et al.,

2009). Σε μια μελέτη, ο μαλβιδινο - 3 -γλυκοζίτης παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε ανθοκυανίνες κρασιού (Rivero-Perez MD. et al., 2008). Αν και ο συνολικός δείκτης φαινολικών ήταν χαμηλότερος στη σάρκα από ότι στον φλοιό σταφυλιών, διότι οι ανθοκυανίνες απουσίαζαν στη σάρκα, κατείχαν ίσες ποσότητες αντιδραστικότητας με ρίζες υδροξυλίου (Falchi M. et al., 2006). Σε μια άλλη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η δράση κατά των ριζών οφειλόταν στις φλαβονόλες, και όχι στις ανθοκυανίνες (Arnous A. et al., 2002).

Μελέτες έδειξαν ότι πολυμερή προκυανιδίνης με υψηλότερους βαθμούς πολυμερισμού είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα (Spranger I. et al., 2008). Ωστόσο, ο *Faria et al.* (2006) έδειξε ότι σε πέντε κλάσματα διαφόρων βαθμών πολυμερισμού προκυανιδίνης, το κλάσμα δευτέρου βαθμού εμφανίζεται με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε άλλη έρευνα ο *Soobratteea et al.* (2005), έδειξε ότι η πιο αντιοξειδωτική ένωση από τα διάφορα φαινολικά ήταν η διμερής προκυανιδίνη, ακολουθούμενη με μειούμενη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις φλαβονόλες, τις φλαβονόλες, τα υδροξυκιναμωνικά οξέα και τα απλά φαινολικά οξέα. Οι διφαινόλες είναι πιο αποτελεσματικές από τις απλούστερες φαινόλες λόγω σταθεροποίησης της φαινοξυ- ρίζας μέσω δεσμών υδρογόνου (Amico V. et al., 2008).

Ο *Pinelo et al.* μελέτησαν την επίδραση του διαλύτη στην αντιοξειδωτική δράση της κατεχίνης, ρεσβερατρόλης σε εκχυλίσματα σταφυλιών που διαλύονται σε αιθανόλη, μεθανόλη και νερό. Η μέγιστη αντιοξειδωτική δραστηριότητα ήταν σε αιθανόλη, στη συνέχεια, σε μεθανόλη, και η ελάχιστη ήταν σε νερό (Pinelo M. et al., 2005).

Τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά των φαινολικών ενώσεων, αποδίδονται κυρίως στην αδρανοποίηση ελευθέρων ριζών και στις ιδιότητες των μετάλλων τους, καθώς και στις επιδράσεις τους στις οδούς κυτταρικής σηματοδότησης και στην γονιδιακή έκφραση (Soobratteea et al., 2005; Dell Agli M. et al., 2005). Για την αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων, η υπεύθυνη χημική λειτουργική ομάδα και δομή είναι τα OH. Ο αριθμός των OH και η θέση τους στο δαχτυλίδι του μορίου καθορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονολών (Agora A. et al., 1998). Όταν το OH προστεθεί πάνω στον φλαβονοειδή πυρήνα, η δραστηριότητα ενισχύεται, ενώ όταν υποκαθίσταται από ομάδες OCH₃, η δραστηριότητα μειώνεται. (Majo et al., 2008; Majo et al., 2005).

5.2.2 . Καρδιοπροστατευτική δράση

Πολλά πειραματικά δεδομένα υπάρχουν για την προστασία του κυκλοφορικού συστήματος με την κατανάλωση προϊόντων από σταφύλια. Εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού προστατεύσαν το ήπαρ αρουραίου κατά της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία *in vivo* , και διατήρησαν τις δραστηριότητες της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της καταλάσης σε κανονικό επίπεδο (Cetin A. et al., 2008).

Εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού (5-50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) πλούσια σε πολυφαινόλες εμφάνισαν μείωση της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και της συσσωμάτωσής τους καθώς και στην παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου, και ήταν περισσότερο αποτελεσματικά από την καθαρή ρεσβερατρόλη (Olas B et al.,2008)12]. Ο Shanmuganayagam et al. (2007) χρησιμοποίησε κουνέλια για να διερευνήσει τις δυνατότητες των φαινολικών ενώσεων μετά από ένα υπερχοληστερολαιμικού σοκ που προκαλείται από τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Μετά την πρόσληψη χυμού σταφυλιών (225 ml / ημέρα), η οποία ήταν πλούσια σε πολυφαινόλες, και με υπερχοληστερολαιμική διαίτα για 96 ημέρες, η συσσωμάτωση αιμοπεταλίων στα κουνέλια βελτιώθηκε σημαντικά και η ανάπτυξη του αθηρώματος ήταν περίπου στο 30 % χαμηλότερη από εκείνη της ομάδας ελέγχου. Ο Dell Agli et al. (2005) έδειξε ότι ανθοκυανίνες από το κρασί και το φλοιό σταφυλιού ανέστειλαν την δραστηριότητα της φωσφοδιεστεράσης - 5, κάτι που μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω της αγγειοχαλάρωσης. Ο Falchi et al. (2006) έκαναν ισχαιμική σε απομονωμένη καρδιά αρουραίων για 30 λεπτά που ακολουθήθηκε από δύο ώρες επαναιμάτωσης, και διαπίστωσε ότι η βλάβη ισχαιμικής επαναιμάτωσης εμποδίστηκε σημαντικά μετά από 30 μέρες κατανάλωσης των εκχυλισμάτων της σάρκας και του φλοιού των σταφυλιών από τους αρουραίους, ενώ ταυτόχρονα τα εκχυλίσματα αυτά είχαν καρδιοπροστατευτική επίδραση.

Ο Castilla et al. (2006), βρήκε ότι οι φαινολικές ενώσεις βελτίωσαν σημαντικά τα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα. Μετά την κατανάλωση 100 ml χυμού κόκκινων σταφυλιών / ημέρα για 14 ημέρες, η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ήταν σημαντικά αυξημένη, και η οξειδωμένη LDL μειώθηκε σημαντικά. Το επίπεδο της HDL και της απολιποπρωτεΐνης A-I στο πλάσμα ήταν επίσης αυξημένο. Επιπλέον, η κατανάλωση του κόκκινου κρασιού οδήγησε σε υψηλές συγκεντρώσεις της HDL χοληστερόλης (Tsanga C. et al., 2005), η οποία συνδέεται με τον έλεγχο του κινδύνου

της στεφανιαίας νόσου. Μετά από τη χορήγηση τροφής με μέτρια δόση εκχυλίσματος σταφυλιών, η χοληστερίνη του πλάσματος μειώθηκε κατά 11% κατά μέσο όρο (Auger C. et al., 2004). Επιπλέον, η συγκέντρωση της απολιποπρωτεΐνης A1 στο πλάσμα αυξήθηκε κατά 26%, 22%, και 19%, προκαλούμενη από πρόσληψη κατεχίνης, κερκετίνης και ρεσβερατρόλης, αντιστοίχως (Auger C. et al., 2005).

5.2.3 . Αντικαρκινικές Ιδιότητες

Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες καθώς και τα εκχυλίσματα από τα σταφύλια και τα προϊόντα του μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου μεταξύ αυτών και του καρκίνου του ήπατος (Korkina et al, 2009; Ramos, 2008).

Για την κερκετίνη η οποία βρίσκεται σε αφθονία στο κόκκινο κρασί *in vitro* μελέτες έδειξαν: Μεταξύ των 68 φυτικών πολυφαινολών που ελέγχθησαν για την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του ήπατος, η κερκετίνη μαζί με την 4- υδροξυφλαβόνη και την λουτεολίνη ήταν οι πιο ισχυρές φλαβόνες (Loa et al., 2009). Οι μοριακοί μηχανισμοί που προτάθηκαν για την ανασταλτική επίδραση της κερκετίνης στην ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων ήταν η απενεργοποίηση πρωτεϊνών επιβίωσης όπως η AKT, ERK, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC -alpha), καθώς και η ενεργοποίηση των σημάτων θανάτου όπως τα c-Jun N-terminal κινάσες (JNK) και PKC - delta (Granado - Serrano et al., 2008). Επιπλέον, η κερκετίνη έχειδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη των HepG2 προκαλώντας αδρανοποίηση των παραγόντων μεταγραφής NP- κB και εν συνεχεία την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης -ενεργοποιητή -1 (AP-1) / JNK που αφορά το μονοπάτι που ρυθμίζει την επιβίωση / πολλαπλασιασμό καθώς και τα σήματα θανάτου (Granado - Serrano et al., 2010). Επίσης, η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην προκαλούμενη από την κερκετίνη κυτταρική απόπτωση των κυττάρων HepG2 (Tanigawa et al., 2008). Συνεπώς, η προκαλούμενη από την κερκετίνη ενεργοποίηση της p53 οδήγησε σε αύξηση της p21 και καταστολή της έκφρασης της κυκλίνης D1 υπέρ της σύλληψης του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην αύξηση της αναλογίας Bax/Bcl-2 υπέρ της απόπτωσης (Tanigawa et al., 2008). Επιπλέον, η κερκετίνη έχει αναφερθεί ότι ενισχύει την προ-αποπτωτική

δράση των αντικαρκινικών φαρμάκων 5-φθοριουρακίλη και καρβοπλατίνη σε Hep3B και HepG2 κύτταρα, αναστέλλοντας την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsps) βοηθώντας τα κύτταρα να προσαρμοστούν στην έκθεση στο φάρμακο και να επιβιώσουν (Sharma et al., 2009).

Σε *in vivo* μελέτες η χορήγηση 10 mg / kg κερκετίνης σε ποντίκια 2 ώρες πριν από την χορήγηση της DEN (διαιθυλικής νιτροσαμίνης) μείωσε την συνολική έκταση και τον αριθμό των νεοπλασματικών αλλοιώσεων (Vázquez - Garzón et al., 2009). Η παρατηρούμενη προστατευτική επίδραση αποδόθηκε στην ενίσχυση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος από την κερκετίνη, δεδομένου ότι υπήρχε μείωση των επιπέδων υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, αύξηση της GSH και της συνολικής γλουταθειόνης καθώς και στην αναλογία GSH / GSSG καθώς και αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)(Vázquez - Garzón et al., 2009). Η κερκετίνη σε μία δόση των 200 mg / kg στους αρουραίους, εμπόδισε την προκαλούμενη από την DEN καρκινογένεση όπως φαίνεται από ιστοπαθολογικές εξετάσεις στο συκώτι των ζώων. Αυτό αποδόθηκε στην αντιοξειδωτική δράση της κερκετίνης, δεδομένου ότι η χορήγηση της μείωσε την μηλονοδιαλδεύδη (MDA) και τα επίπεδα της GSH, καθώς και την δράση της GPx και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης(GR) (Seufi et al., 2009; Sánchez - Pérez et al., 2005).

Έτσι, η κερκετίνη φαίνεται να ασκεί την χημειοπροστατευτική της δράση μέσω της αναστολής και της επαγωγής των μονοπατιών της επιβίωσης και του θανάτου αντίστοιχα στα κύτταρα του καρκίνου του ήπατος. Επιπλέον, σε μελέτες σε ζώα, η κερκετίνη προστατεύει από ηπατική καρκινογένεση που προκαλείται από την DEN ή την AFB και αυτό οφείλεται κυρίως στην ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση και συνεπώς στην πρόληψη μεταλλάξεων του DNA σε κρίσιμα γονίδια υπεύθυνα για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου , όπως το p53 . Αν και υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την τοξικότητα και την ασφάλεια της κερκετίνης, μελέτες σε ανθρώπους δεν έχουν δείξει ανεπιθύμητες επιδράσεις που να σχετίζονται με τη χορήγηση από το στόμα της κερκετίνης σε μία δόση έως και 4 g ή μετά από ένα μήνα σε δύο δόσεις των 500 mg ημερησίως (Russo et al., 2012).

Η trans -ρεσβερατρόλη, ουσία που ανήκει στα στυλβένια και βρίσκεται στα σταφύλια και την φλούδα τους κατά την παραγωγή κρασιού έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντικαρκινικές της ιδιότητες. Σε in vivo μελέτες έχει δείξει ότι αναστέλλει την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυττάρων καρκίνου του ήπατος (HCC), όπως τα ανθρώπινα καρκινικά ηπατοκύτταρα HepG2 (Kuo et al., 2002; Stervbo et al., 2006) Hep3B (Kuo et al., 2002) και H22 (Sun et al., 2002) , ηπατώματος αρουραίου FAO (Delmas et al., 2000) και H4IIE (Michels et al., 2006), και ηπατώματος του αρουραίου ασκίτη AH109A (Kozuki et al., 2001). Ο βασικός μηχανισμός ανάπτυξης της ανασταλτικής επίδρασης της trans-ρεσβερατρόλης εναντίον των κυττάρων του καρκινικού ηπατώματος φαίνεται να είναι η πρόκληση της απόπτωσης και της σύλληψης του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, Ο Sun et al. (2002) έδειξε ότι η ανάπτυξη της ανασταλτικής επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης κατά των κυττάρων του ηπατώματος H22 οφειλόταν σε απόπτωση . Επίσης, η trans - ρεσβερατρόλη προκάλεσε απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης σε H4IIE κύτταρα (Michels et al., 2006) . Επιπλέον , ο Kuo et al. (2002) έδειξε ότι η trans - ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση περίπου 40-80 μM ανέστειλε την ανάπτυξη των p53-θετικών κυττάρων HepG2, αλλά όχι των p53-αρνητικών καρκινικών κυττάρων ήπατος Hep3B, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρόκληση απόπτωσης οφειλόταν στο p53-εξαρτώμενο μονοπάτι.

Επιπλέον, ο Parekh et al. (2011) διαπίστωσαν ότι η trans - ρεσβερατρόλη ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 λόγω μείωσης της έκφρασης και της δραστηριότητας της κυκλίνης D1, p38MAPK, Akt και PAK1. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες, ο De Lédighen et al. (2001) έδειξε ότι η trans-ρεσβερατρόλη μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HepG2 αλλά αυτό δεν οφειλόταν σε κυτταροτοξικότητα ή απόπτωση, αλλά σε έναν μηχανισμό μετα-υποδοχέα.

Η χημειοπροληπτική δράση της trans – ρεσβερατρόλης έχει δειχτεί και με πολλές in vivo μελέτες. Ο Khanduja et al. (2004) βρήκαν ότι η χορήγηση της trans – ρεσβερατρόλης σε ποντικούς για δύο εβδομάδες σε δόση 2.5 mg/kg σωματικού βάρους ανέστειλε την από την DEN εξαρτώμενη αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) στο ήπαρ καθώς και την δραστηριότητα των κυκλοοξυγενασών. Το ODC είναι ένα ένζυμο περιορισμού στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της πολυαμίνης και είναι στενά συνδεδεμένο με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση (

Wolter et al., 2004). Οι κυκλοοξυγενάσες είναι ένζυμα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των προστανοειδών που εμπλέκονται στη διαδικασία δημιουργίας μιας φλεγμονής, και ειδικότερα της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) που εμπλέκεται στην εξέλιξη και την αγγειογένεση των καρκίνων (Wu et al., 2010). Οι Bishayee και Dhir (2009) έδειξαν ότι η χορήγηση από το στόμα της trans - ρεσβερατρόλης σε δόσεις από 50 έως 300 mg / kg σωματικού βάρους για 20 εβδομάδες μείωσε την συχνότητα εμφάνισης, τον συνολικό αριθμό και την πολλαπλότητα των ορατών οξιδίων ηπατοκυττάρων σε αρουραίους σε ένα μοντέλο καρκινογένεσης δύο σταδίων που αφορά αρχικά εισαγωγή της DEN και εν συνεχεία της φαινοβαρβιτάλης . Η αντι - καρκινογόνος επίδραση αποδόθηκε στην πρόκληση απόπτωσης μέσω της αύξησης της προ - αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και στην μείωση της αντι- αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl -2 (Bishayee και Dhir, 2009). Αυτή η χημειοπροστατευτική δράση της trans - ρεσβερατρόλης αποδόθηκε και στην εξασθένηση του οξειδωτικού στρες και την καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω του πυρηνικού παράγοντα E2 και του σχετιζόμενου παράγοντα (Nrf2) (Bishayee et al., 2010a), καθώς και της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (Hsp70) , COX-2 και NF – kB (Bishayee et al., 2010b).

Όπως συνάγεται από τα ανωτέρω, η αντικαρκινική δράση της trans - ρεσβερατρόλης εναντίον του καρκίνου του ήπατος (HCC) περιλαμβάνει απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου με την διαφοροποίηση της έκφρασης και της δραστηριότητας των προ - αποπτωτικών , αντι - αποπτωτικών και των πρωτεϊνών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, καθώς και του αντι- μεταστατικού και αντι-αγγειογενετικού δυναμικού μέσω της διαφοροποίησης της έκφρασης των προ-αγγειογενετικών μορίων. Δύο κλινικές μελέτες που έχουν πρόσφατα δημοσιευθεί δείχνουν ότι η πρόσληψη 2,5g trans-ρεσβερατρόλης για 29 ημέρες, μείωσε το επίπεδο στο πλάσμα του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης-1 και της δεσμευτικής πρωτεΐνης 3, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή επίδραση της trans-ρεσβερατρόλης στην πρόληψη κατά του καρκίνου (Brown et al., 2010). Επιπλέον, χορήγηση 0,5 και 1,0 g trans-ρεσβερατρόλης/ ημέρα για 29 ημέρες μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στον ιστό του καρκίνου του παχέος εντέρου (Patel et al., 2010). Ο Hudson et al. (2007)⁹⁰ ανέφερε ότι το εκχύλισμα φλοιού σταφυλιού προκάλεσε απόπτωση σε κυτταρικές σειρές όγκου του προστάτη με υψηλά ποσοστά. Το εκχύλισμα από πυρήνες που απομένουν μετά την οινοποίηση ανέστειλε τις δραστηριότητες των μεταλλοπρωτεϊνών - 2 και -9 της μήτρας , και εξέφρασε μια σημαντική αντι-

πολλαπλασιαστική επίδραση σε ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (Caco - 2) , κάτι που δείχνει ότι το υποπροϊόν του κρασιού μπορεί να συμβάλει στην καταπολέμηση της καρκινογένεσης (God JM et al., 2007; Lazze MC. & Pizzala R., 2009). Φαινολικές ενώσεις χυμού σταφυλιών, ανέστειλαν τη σύνθεση του DNA σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Singletary KW et al., 2003).

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια έχουν μελετηθεί ευρέως και ο διαμορφούμενος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων ήταν αξιοσημείωτα δοσοεξαρτώμενος (Ramos et al., 2005). Σε υψηλή συγκέντρωση, αποδόθηκε άμεση τοξική επίδραση που οδηγεί τα κύτταρα σε θάνατο [Saleem et al., 2002). Ερευνήθηκε επίσης η σχέση μεταξύ αντικαρκινικής δράσης και δομής των φαινολικών ενώσεων. Ο στόχος της ρύθμισης των εκχυλισμάτων από φλοιό σταφυλιού στην κυτταρική απόπτωση ήταν η φωσφατιδυλινοσιτόλη 3- κινάση Akt. Τα εκχυλίσματα μείωσαν την μεταγραφή της Akt , και ενίσχυσαν την πρωτεοσωμική υποβάθμιση (Hudson et al., 2007).

5.2.4 . Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια , ιδιαίτερα στους σπόρους σταφυλιών , έδειξαν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση σε αρουραίους , ποντίκια και ανθρώπους (Chacona et al., 2009; Panico et al., 2006; Terra et al., 2009), και τα υπεύθυνα μόρια μπορεί να είναι φλαβονόλες , φλαβονοειδή και προκυανιδίνες (ολιγομερή φλαβονοειδή) (Chacona et al., 2009; Panico et al., 2006; Terra et al., 2009). O Bralley et al. (2007) βρήκε ότι τα εκχυλίσματα από φλούδες και σπόρους σταφυλιών ανέστειλαν σε αντί ποντικίου φλεγμονή , οίδημα και διείσδυση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων που προκαλείται από το 12 -O- δεκατετρανοϋλοφορβόλης 13- αιθυλεστέρα, μετά από αγωγή με τα εκχυλίσματα διάρκειας 30 λεπτών. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι οι φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια προφανώς κατέχουν αντιφλεγμονώδη δράση .

Ο αντι- φλεγμονώδης μηχανισμός της προκυανιδίνης ερευνήθηκε , και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να αναστείλει την απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων . Η ανοσορρύθμιση ήταν η κύρια οδός δράσης, και η

αντιοξειδωτική η δευτερεύουσα για την αντι – φλεγμονώδη επίδραση των φαινολικών ενώσεων των σταφυλιών (Chacona et al., 2009; Panico et al., 2006; Li et al., 2001).

Αναστολή ή μείωση της έκφρασης του γονιδίου της κυτταροκίνης μπορεί να είναι μια βασική οδός για την αντι – φλεγμονώδη δράση φαινολικών ουσιών των σταφυλιών [Chacona et al., 2009; Terra et al., 2009; Li et al., 2001). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι προκυανιδίνες στα σταφύλια αναστέλουν την φλεγμονή σε επίπεδα mRNA, και τα μεγάλα ωφέλη για την υγεία προέρχονται από αυτές καθώς εμπλέκονται με την μείωση του κινδύνου από ασθένειες που συνδέονται με διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και την παχυσαρκία, όπως καρδιαγγειακές και μεταβολικές διαταραχές.

5.2.5 . Αντιγηραντικές ιδιότητες

Διαπιστώθηκε ότι όταν πολυφαινολικές ενώσεις περιέχονται σε τρόφιμα μπορεί να είναι επωφελής για την αναστροφή της πορείας της νευρωνικής και συμπεριφορικής γήρανσης. Λόγω της αξιοσημείωτης αντιοξειδωτικής τους δράσης , όπως της σαρώσεως ελευθέρων ριζών , θα μπορούσαν να αποτρέψουν ιστούς και όργανα από οξειδωτική βλάβη , και να τροποποιήσουν τον αρνητικό μηχανισμό οξειδοαναγωγής στο σώμα. Τα αποδεικτικά στοιχεία ελήφθησαν παρατηρώντας τις συμπεριφορές των αρουραίων , από την ηλικία των 19 έως 21 μηνών. Μετά την κατανάλωση χυμού σταφυλιών 10%, υπήρξε βελτίωση στην απελευθέρωση της ντοπαμίνης, ενώ με χυμό σταφυλιών 50% υπήρξε βελτίωση της συνολικής δραστηριότητας (Shukitt-Hale et al., 2006). Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι σε συμπλήρωμα με εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού (100 mg / kg b.wt.) για 30 ημέρες, οι φαινολικές ενώσεις από τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε νευρικό ιστό (Balu et al., 2006). Ο Balu et al. (2005) ανέφεραν την μειωμένη συχνότητα των ελεύθερων ριζών που προκαλούνται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ηλικιωμένων αρουραίων.

5.2.6. Αντιμικροβιακή δράση

Στις φυτικές πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί πιθανές αντιβακτηριακές (Garcia-Alonso et al., 2006; Balu et al., 2005; Baydar et al., 2006), αντιμυκητιακές (Bruno et

al., 2007; Jung et al., 2005) και αντι-ικές (de Bruyne et al., 1999; Chavez et al., 2006) ιδιότητες. Οι Rodriguez- Vaquero et al. (2007) έδειξαν ότι το κρασί ανέστειλε την μικροβιακή ανάπτυξη, ειδικά του *Escherichia coli*, και η αναστολή αυξήθηκε καθώς η συγκέντρωση σε πολυφαινόλες αυξάνονταν. Τα εκχυλίσματα κόκκινου και λευκού κρασιού, χωρίς αλκοόλ, παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση στο *Candida albicans* (Papadopoulou et al., 2005). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα κόκκινα κρασιά ήταν υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές επιδράσεις. Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι φαινολικές ενώσεις ανέστειλαν την ανάπτυξη άλλων τροφιμογενών μικροβίων, όπως *Salmonella typhimurium* (Sivaroban et al., 2008) και *Listeria monocytogenes* (Luther et al., 2007).

Διάφορα είδη βακτηρίων παρουσιάζουν διαφορετικές ευαισθησίες στις φαινολικές ενώσεις. Η Παπαδοπούλου et al. (2005) κατέδειξε ότι ο *Staphylococcus aureus* ήταν πιο ευαίσθητος σε εκχυλίσματα οίνου, ακολουθούμενη από την *Escherichia coli* ενώ η μικρότερη ανασταλτική επίδραση ανιχνεύθηκε στο *Candida albicans*. Ο Baydar et al. (2006) έδειξε ότι το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού ενήργησε κατά του *Staphylococcus aureus* μετά από 48 ώρες και κατά του *Aeromonas hydrophila* μετά από μία ώρα.

Οι φαινολικές ενώσεις από διάφορα μέρη των σταφυλιών εμφανίζουν διαφορετική αντιμικροβιακή δράση. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του πυρήνα του σταφυλιού που έχουν υποστεί ζύμωση είτε ήταν εξίσου αποτελεσματική ή σημαντικά καλύτερη από εκχυλίσματα ολόκληρων καρπών σταφυλιού (Thimothe et al., 2007). Ορισμένες έρευνες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σπόρων ήταν πιο αποτελεσματικά στην αντιμικροβιακή τους δράση από άλλα μέρη των σταφυλιών. Τα εκχυλίσματα από ολόκληρους καρπούς σταφυλιού ανέστειλαν την ανάπτυξη των βακτηρίων σε συγκεντρώσεις των 680 mg GAE / L και 1360 mg GAE / L για Gram (+) και Gram (-) βακτηρίδια, αντίστοιχα. Ο Jayaprakasha et al. (2003) [109] έδειξαν ότι εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού ανέστειλαν την ανάπτυξη των βακτηρίων από 340 έως 390 mg GAE / L και 475 έως 575 mg GAE / L για Gram (+) και Gram (-) βακτηρίδια, αντίστοιχα. Το εκχύλισμα των φύλλων σταφυλιών παρουσίασε επίσης λιγότερο αντιμικροβιακή δράση από τα εκχυλίσματα σπόρων. Το εκχύλισμα από σάρκα σταφυλιού δεν παρουσίασε καμία αντιμικροβιακή δράση (Yigit et al., 2009). Ο Brown et al. (2009) έδειξε ότι ο φλοιός σταφυλιών κατείχε την ισχυρότερη δράση στο *Helicobacter pylori*, που ακολουθείται από την συνέργεια φλοιού και σπόρων και

των σπόρων. Η σειρά αύξησης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας ήταν σάρκα, εκχυλίσματα ολόκληρων φρούτων σταφυλιού, πυρήνες που έχουν υποστεί ζύμωση, ο φλοιός, φύλλα και σπόροι.

Οι φαινολικές ενώσεις στο σταφύλι όπως η ρεσβερατρόλη εμφανίζουν ισχυρή αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι των ανθρώπινων παθογόνων μυκήτων *Candida albicans* σε συγκεντρώσεις 10-20 μL . Το αξιοσημείωτο πλεονέκτημα των φαινολικών ενώσεων είναι ότι δεν παρουσίασαν καμία αιμολυτική δράση κατά των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, σε σύγκριση με τα χημικά φάρμακα (Jung et al., 2005). Η Αναστασιάδη et al. (2009) πρότειναν ότι η υψηλή συγκέντρωση των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους στους σπόρους σταφυλιού και των φλαβονοειδών, στιλβένια, και φαινολικά οξέα στο στέλεχος (βόστρυχος) ήταν υπεύθυνα για την αντιμικροβιακή τους δράση. Ο Rodriguez- Vaquero et al. (2007) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το μη φλαβονοειδές καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή ρουτίνη και κερκετίνη ήταν οι ενώσεις με την υψηλότερη ανασταλτική δράση κατά της ανάπτυξης του *Listeria monocytogenes*. Ο Rhodes et al. (2006) έδειξε ότι πολυμερισμένα φαινολικά κλάσματα ενήργησαν με την υψηλότερη ανασταλτική δράση για όλα τα είδη *Listeria*, αλλά όχι για άλλα βακτηρίδια, όπως *Bacillus cereus*, *Salmonella Menston*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ή *Yersinia enterocolitica*.

Η σχέση μεταξύ της δομής της φαινολικής ενώσεως και της αντιμικροβιακής δραστηριότητάς της έχει διερευνηθεί. Φαίνεται ότι ο αριθμός των υδροξυλίων και ο βαθμός πολυμερισμού είναι καθοριστικός για την αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων (Tagurt et al., 2004). Η εφαρμογή των φαινολικών ενώσεων θα μπορούσε να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην συντήρηση των τροφίμων από ό, τι στον ιατρικό τομέα (Serra et al., 2008; Luther et al., 2007), και η ισχυρή λειτουργία των φαινολικών ως τέλειων φυσικών συντηρητικών και αντιμικροβιακών παραγόντων για τα τρόφιμα είναι πολύ ελπιδοφόρα.

6.ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έχει δείχτει ότι εκχυλίσματα βόστρυχων έχουν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση ενώ αναστέλουν και την αύξηση καρκινικών κυττάρων από διάφορους καρκινικούς τύπους (Sahrazidou και συν., 2014; Apostolou και συν., 2013). Επίσης, μελέτες του ίδιου εργαστηρίου έδειξαν ότι το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2 μέσω απόπτωσης (Κερμελιώτου 2011). Επιπλέον, το συγκεκριμένο εκχύλισμα είχε και αντι-αγγειογενετική δράση μέσω αναστολής του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGF) (Κερμελιώτου 2011).

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων HepG2 με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η ανασταλτική δράση στην αύξηση αυτών των κυττάρων. Μάλιστα, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με το εκχύλισμα για δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, για 4 και 24 ώρες. Αυτό έγινε γιατί παρατηρήθηκε μικροσκοπικά ότι ήδη από τις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα κύτταρα άλλαζαν μορφολογία και γίνονταν αποπτωτικά. Έτσι, θέλαμε να εξετάσουμε κατά πόσο αλλάζει η γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα HepG2 λόγω της επίδρασης του εκχυλίσματος ανάμεσα στα πρώιμα και σε μεταγενέστερα στάδια αναστολής της κυτταρικής αύξησης. Επίσης, υπολογίστηκε και το IC50 στην κυτταρική αύξηση μετά από 4 ώρες επώασης (το IC50 στις 24 ώρες επώασης ήταν ήδη γνωστό από προηγούμενη μελέτη).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και Merck (Γερμανία).

1.1.2. Θρεπτικά υλικά

Για την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM high glucose) της εταιρείας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum) της εταιρείας Biochrom. Για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% (Gibco).

1.1.3. Εκχύλισμα

Το εκχύλισμα που εξετάστηκε ήταν από βόστρυχο αμπέλου (*Vitis vinifera*) της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης και απομονώθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο του Καθηγητή κ. Χαρουτουγιάν. Η σύστασή του παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος

ΚΑΘΑΡΑ ΜΟΡΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ mg/g στερεού εκχυλίσματος
Γαλλικό οξύ	8,38
(+)- κατεχίνη	7,35
(-)-επικατεχίνη	15,23
Trans- ρεσβερατρόλη	2,15
Κερκετίνη	7,54
Καφεϊκό οξύ	0,31
p-Κουμαρικό οξύ	0,41
Καμπφερόλη	1,04
Φερουλικό οξύ	0,31

Συριγγικό οξύ	0,80
Ρουτίνη	16,00
TPC	372,00

TPC: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (mg γαλλικού οξέος/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)

Διαδικασία εκχύλισης: Τα υπέργεια τμήματα των φυτών αποξηράνθηκαν και κονιοροποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ποσότητες των τμημάτων φυτών χρησιμοποιήθηκαν για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v), (αιθανόλη 2/1 v/v) σε ειδική συσκευή αυτόματης εκχύλισης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε εκχύλιση διήρκησε 48 ώρες. Στη συνέχεια, ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων υπό κενό. Κατόπιν η ξηρή ποσότητα των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό για την πραγματοποίηση *in vitro* δοκιμών.

1.1.4. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2

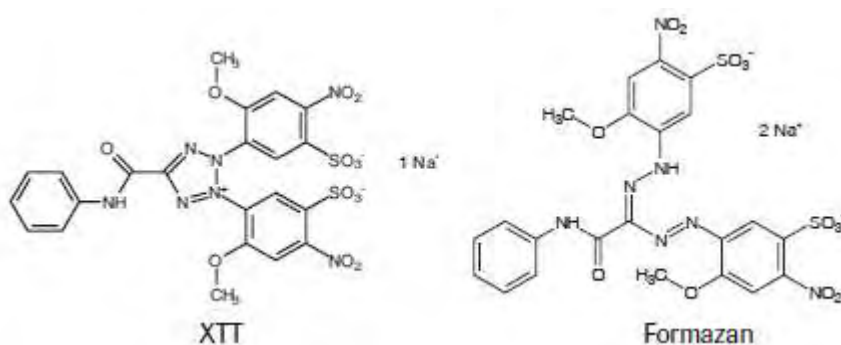
Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 καλλιεργήθηκαν σε 75-cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) (Gibco BRL) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι γεμάτη με κύτταρα στο 80%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης 0,25%. Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 7 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναϊώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5 mL) εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

1.1.5. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT

Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης στην αύξηση των κυττάρων HepG2 χρησιμοποιήθηκε το kit

XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) (Εικόνα 2) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση.



Εικόνα 2: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό formazan από ζωντανά κύτταρα.

Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των HepG2 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 4 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. (Το μίγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν μόνο ηπατικά κύτταρα και το XTT/reagent, καθώς και δείγματα μάρτυρες που περιέχουν τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των ουσιών επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση

προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 490 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$

1.1.6. Απομόνωση RNA από τα κύτταρα HepG2 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από βόστρυχους αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης

Μετά την αποκόλληση των HepG2 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, και καλλιέργειά τους σε τριβλία (100 mm). Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37⁰C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε συγκέντρωση του εκχυλίσματος ίση με 50 µg/ml σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 10 ml. Επιλέχτηκε αυτή η συγκέντρωση γιατί ήταν κάπως μικρότερη από το IC₅₀ του εκχυλίσματος στα κύτταρα HepG2, το οποίο είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη (Κερμελιώτου 2011) να είναι 80 µg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, για 4 και 24 ώρες. Για κάθε χρονική περίοδο χρησιμοποιήθηκαν τριπλά δείγματα και αντίστοιχες καλλιέργειες μάρτυρες.

Μετά την επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, πλένουμε μία φορά με 3ml PBS (pH 7.4), προσθέτουμε 10 ml PBS και συλλέγουμε τα κύτταρα με cell scraper. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε σωλήνες των 15ml και φυγοκεντρούμε (300g, 5min, 4 °C), διώχνουμε το υπερκείμενο και μεταφέρουμε το ίζημα των κυττάρων σε σωληνάκια των 2 ml. Στη συνέχεια για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήσαμε το RNeasy kit (Invitrogen). Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 600 µl buffer RLT και λύουμε τα κύτταρα με ομογενοποιητή (μέγιστη ταχύτητα για 30 sec). Μετά προσθέτουμε ίσο όγκο (600ul) 70% αιθανόλης αποστειρωμένης και ακολουθούμε τα στάδια που περιγράφει το kit. Στο τέλος προσθέτουμε 50µl νερού (RNase free water) και ανάδευση των δειγμάτων για επαναδιάλυση του RNA. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης και ανάλυση του RNA

Η ανάλυση και ποσοτικοποίηση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) και του Agilent 2100 Bioanalyzer. Στον πίνακα 3 φαίνονται οι μετρήσεις των RNA δειγμάτων από την ανάλυση με το NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης του RNA με τη χρήση του NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

Δείγμα	Συγκέντρωση ολικού RNA (ng/μl)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
1	276	1,68	2,01
2	449	1,78	2,39
3	422	1,97	2,31
4	344	2,02	2,26
5	268	1,83	2,29
6	296	2,09	2,03
7	205	2,05	2,08
8	229	1,82	2,31
9	190	1,83	2,37
10	223	1,99	2,28
11	192	2,15	1,78
12	145	2,19	1,51

1.1.7. Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης με ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays analysis) στα κύτταρα HepG2 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από βόστρυχους αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης

Αρχή της μεθόδου

Με την τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών και ιδιαίτερα των μεταγραφικών (transcriptomic) μικροσυστοιχιών, μπορούν να καθοριστούν τα επίπεδα χιλιάδων mRNA, και επομένως τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο. Οι μικροσυστοιχίες είναι μια σημαντική πρόοδος τόσο γιατί περιέχουν έναν πολύ μεγάλο αριθμό γονιδίων όσο και εξαιτίας του μικρού τους

μεγέθους. Τα χαρακτηριστικά τους τις καθιστούν πολύ χρήσιμες όταν κάποιος θέλει να προσδιορίσει γρήγορα την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων ή όταν το δείγμα, που πρόκειται να μελετηθεί, είναι μικρό. Οι μικροσυστοιχίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να γίνει ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με ένα μόνο δείγμα ή προκειμένου να συγκριθεί η γονιδιακή έκφραση σε δυο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ή σε διαφορετικά είδη ιστών.

Μια μικροσυστοιχία λειτουργεί εκμεταλλευόμενη την ιδιότητα ενός συγκεκριμένου μορίου mRNA, να συνδέεται εξειδικευμένα, δηλαδή να υβριδίζει, με το μητρικό DNA από το οποίο προήλθε. Χρησιμοποιώντας μια συστοιχία, η οποία περιέχει πολλά δείγματα DNA, οι επιστήμονες μπορούν να καθορίσουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μετρώντας μόνο το ποσό του υβριδισμένου mRNA σε κάθε σημείο πάνω στη συστοιχία. Με τη βοήθεια ενός υπολογιστή μπορεί να καταγραφεί με ακρίβεια η ποσότητα του mRNA που συνδέθηκε με τα επιτόπια (spots) της μικροσυστοιχίας, δημιουργώντας έτσι ένα προφίλ γονιδιακής έκφρασης μέσα στο κύτταρο.

Έτσι, οι DNA μικροσυστοιχίες είναι μικρά στέρεα υποστηρίγματα (support) πάνω στα οποία είναι ακινητοποιημένες ή προσαρτημένες οι αλληλουχίες χιλιάδων διαφορετικών γονιδίων σε καθορισμένες θέσεις. Τα υποστηρίγματα είναι συνήθως αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου αλλά μπορούν να είναι επίσης τσιπς σιλκόνης ή μεμβράνες από νάιλον. Το DNA τυπώνεται, τοποθετείται ή στην πράξη συντίθεται άμεσα πάνω στο υποστήριγμα. Είναι σημαντικό οι ακολουθίες των γονιδίων σε μια μικροσυστοιχία να είναι προσκολλημένες πάνω στο υποστήριγμα κατά ένα συγκεκριμένο τρόπο επειδή η θέση κάθε επιτόπιου (spot) της συστοιχίας χρησιμοποιείται προκειμένου να ταυτοποιηθεί μια ειδικότερη αλληλουχία γονιδίου. Τα επιτόπια μπορούν να είναι DNA, cDNA ή ολιγονουκλεοτίδια (ένα μικρό κομμάτι μονόκλωνου DNA που έχει μήκος συνήθως 5 με 50 νουκλεοτίδια).

Όπως αναφέρθηκε η όλη διαδικασία των DNA μικροσυστοιχιών βασίζεται στην ανίχνευση μέσω υβριδισμού, μια τεχνική που χρησιμοποιεί μόρια νουκλεϊνικού οξέος σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική ως «κινητούς ανιχνευτές» προκειμένου να ταυτοποιήσει συμπληρωματικά μόρια, αλληλουχίες που μπορούν να ζευγαρώσουν με άλλες. Έτσι, όταν δυο συμπληρωματικές ακολουθίες συναντώνται, όπως ο ακινητοποιημένος στόχος DNA και ο κινητός ανιχνευτής (DNA, cDNA ή mRNA) τότε υβριδίζουν μεταξύ τους. Αν για παράδειγμα, θέλουμε να προσδιορίσουμε το προφίλ έκφρασης των γονιδίων σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους

απομονώνεται το συνολικό mRNA από κάθε κυτταρικό τύπο και χρησιμοποιείται ως μήτρα για να παραχθεί cDNA με προσκολλημένη μια 'φθορίζουσα ουρά'. Διαφορετικές 'ουρές' (κόκκινες και πράσινες) χρησιμοποιούνται για το mRNA των δύο διαφορετικών κυτταρικών τύπων έτσι ώστε τα δείγματα να διαφοροποιούνται στα ακόλουθα βήματα. Στη συνέχεια τα δύο σημασμένα δείγματα αναμιγνύονται και επωάζονται μαζί με μια μικροσυστοιχία, η οποία περιέχει ακινητοποιημένα ταγονίδια. Τα σημασμένα μόρια συνδέονται πάνω στα σημεία της συστοιχίας, που αντιστοιχούν στα γονίδια, που εκφράζονται σε κάθε κύτταρο. Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο του υβριδισμού η μικροσυστοιχία τοποθετείται σε κάποια συσκευή ανάγνωσης ή σάρωσης (scanner), που αποτελείται από κάποια laser, ένα ειδικό μικροσκόπιο και μια φωτογραφική μηχανή. Οι φθορίζουσες ουρές διεγείρονται από τις ακτίνες laser και το μικροσκόπιο και η μηχανή χρησιμοποιούνται από κοινού προκειμένου να σχηματίσουν μια ψηφιακή εικόνα της συστοιχίας. Τα δεδομένα φυλάσσονται στη συνέχεια στον υπολογιστή και ακολούθως χρησιμοποιείται κάποιο ειδικό πρόγραμμα είτε για να υπολογίσει την αναλογία φθορισμού κόκκινο προς πράσινο είτε για να εξάγει δεδομένα για κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας αναλύοντας την ψηφιακή εικόνα της συστοιχίας (Εικόνα 3). Εάν υπολογίζει λόγους, το πρόγραμμα μπορεί να δημιουργήσει έναν πίνακα που περιέχει τις αναλογίες της έντασης του κόκκινου προς πράσινου φθορισμού για κάθε σημείο πάνω στη συστοιχία. Έτσι, ο υπολογιστής μπορεί να συμπεράνει ότι και οι δυο κυτταρικοί τύποι εκφράζουν ένα γονίδιο στον ίδιο βαθμό, ότι το ένα κύτταρο εκφράζει περισσότερο κάποιο γονίδιο σε σύγκριση με το άλλο κύτταρο και ότι κανένα από τα δυο κύτταρα δεν εκφράζει κάποιο γονίδιο.



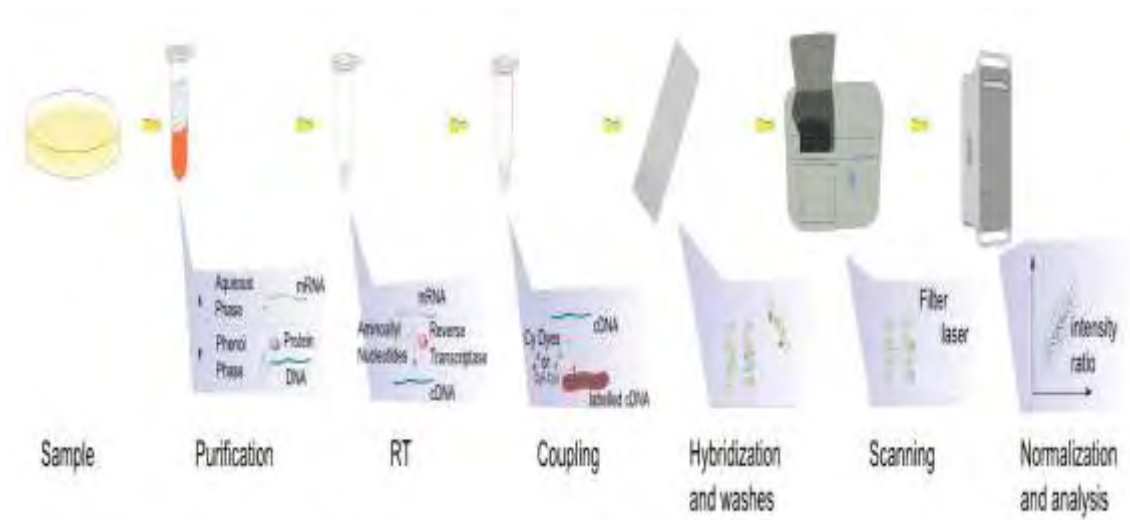
Εικόνα 3. Τα χρώματα μιας μικροσυστοιχίας. Κάθε σημείο πάνω στη συστοιχία σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Το πράσινο αντιπροσωπεύει το μάρτυρα DNA που υβριδίζει με το στόχο DNA, το κόκκινο αντιπροσωπεύει το δείγμα DNA που υβριδίζει με το στόχο DNA και το κίτρινο αντιπροσωπεύει ένα συνδυασμό δείγματος και μάρτυρα DNA, όπου και τα δυο είδη DNA υβριδίζουν εξίσου με το στόχο DNA, το μαύρο αντιπροσωπεύει περιοχές, όπου ούτε ο μάρτυρας ούτε το δείγμα DNA υβριδίζουν με το στόχο DNA.

Πειραματική διαδικασία

Για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα HepG2 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από βόστρυχους αμπέλου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης, τα RNA δείγματα στάλθηκαν στο κέντρο γενωμικής του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης όπου χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία HumanHT-12 v4 Expression BeadChip της εταιρείας Illumina. Κάθε μικροσυστοιχία HumanHT-12 v4 Expression BeadChip περιέχει περίπου 47000 DNA αλληλουχίες που καλύπτουν μεταγραφικά όλα τα γονίδια του ανθρώπινου γενώματος, τις περιοχές του στις οποίες πιθανόν να υπάρχουν γονίδια καθώς και ακολουθίες εναλλακτικών μεταγραφημάτων (spliced transcripts).

Για την πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

1. Η συγκέντρωση του RNA στα δείγματα άλλαξε έτσι ώστε να είναι 50 ng/μl. Στη συνέχεια 11 μl από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί συμπληρωματικό RNA (cRNA) επισημασμένο με βιοτίνη χρησιμοποιώντας το Illumina® TotalPrep™-96 RNA amplification kit (Ambion, Life Technologies).
2. Στη συνέχεια 1500 ng από το επισημασμένο με βιοτίνη RNA από κάθε δείγμα υβριδοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο άμεσης υβριδοποίησης για γονιδιακή έκφραση σε ολόκληρο το γένωμα της εταιρείας Illumina, έναντι των μικροσυστοιχιών HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina) που είναι σχεδιασμένα για την ανίχνευση 47000 μεταγραφημάτων.
3. Μετά την υβριδοποίηση έγινε πλύση των μικροσυστοιχιών και επισήμανσή τους με streptavidin-Cy3.
4. Η ποσοτική ανάλυση του φθορισμού από τις μικροσυστοιχίες έγινε με BeadArray scanner (Illumina) και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό BeadStudio software.

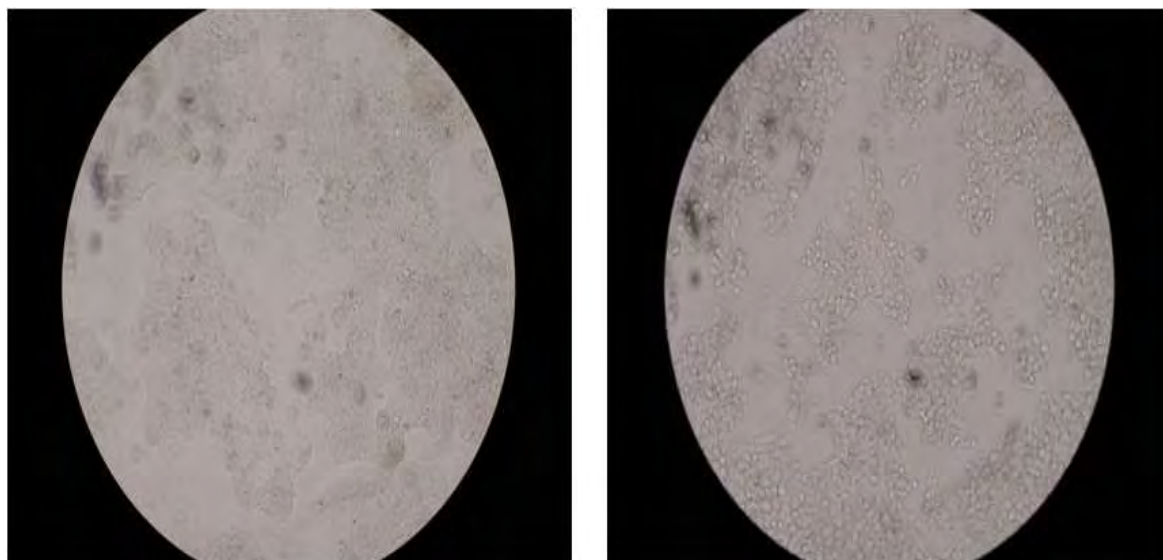


Εικόνα 4. Στο σχήμα απεικονίζονται τα διαφορετικά στάδια για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης στάδια με ανάλυση με DNA μικροσυτοιχίες.

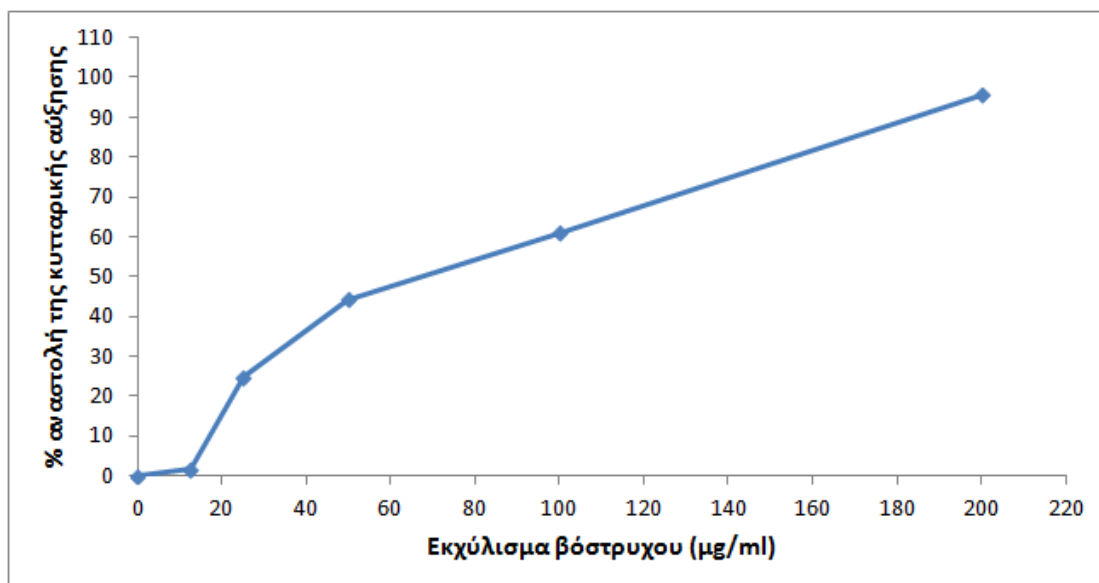
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου στην αύξηση των κυττάρων HepG2

Στο Διάγραμμα 1 φαίνεται η επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 μετά από επώαση 4 h, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT. Από το διάγραμμα υπολογίστηκε το IC50 που ισούται με 70 µg/ml. Σε προηγούμενη μελέτη (Κερμελιώτου 2011) είχε βρεθεί ότι το IC50 μετά από επώαση 24 h ήταν 80 µg/ml. Στην Εικόνα 1 φαίνεται η αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων HepG2 μετά την επώαση για 4 h με το εκχύλισμα βόστρυχου. Τα κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά απόπτωσης όπως ελάττωση του μεγέθους τους και δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων.



Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από κύτταρα HepG2 που δεν επώαστηκαν με το εκχύλισμα (αριστερή εικόνα) και από κύτταρα που επώαστηκαν για 4 h με το εκχύλισμα βόστρυχου (δεξιά εικόνα). Φαίνεται χαρακτηριστικά η αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων με σμίκρυνση τους και σχηματισμό αποπτωτικών σωματιδίων.



Διάγραμμα 1: Απεικονίζεται η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων από την επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης μετά από επώαση 4 h. * $p < 0,05$ σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν το εκχύλισμα (αρνητικοί μάρτυρες).

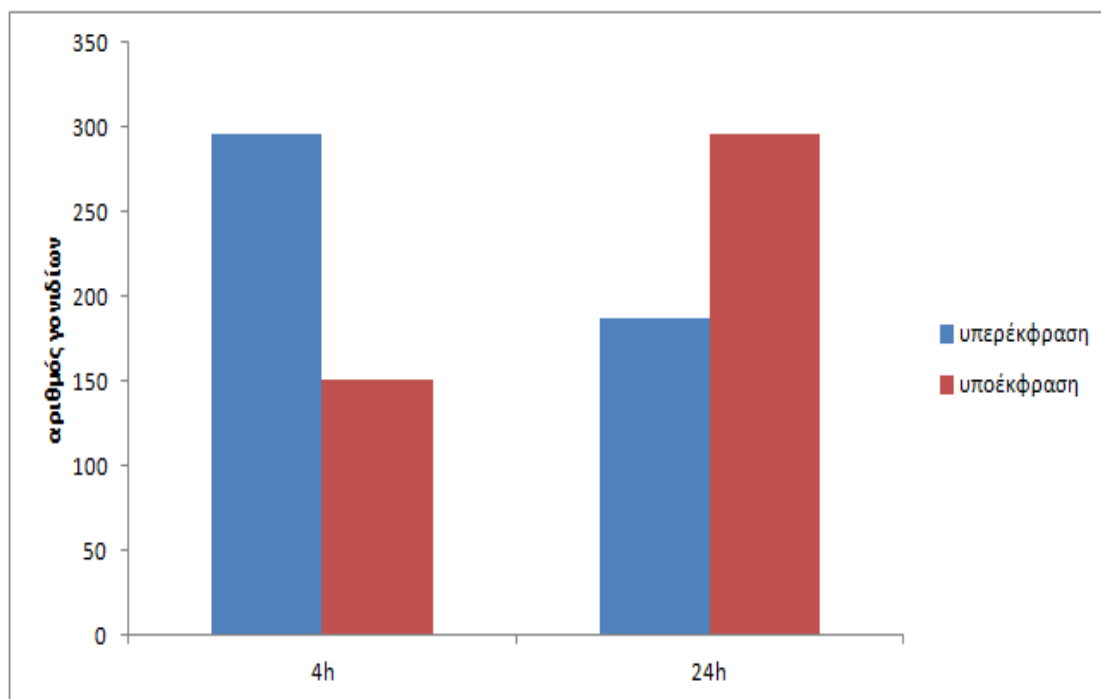
Διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Fold change analysis)

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επωάστηκαν για 4 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 296 γονίδια και υποεκφράστηκαν 151 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Όλα τα γονίδια και η αντίστοιχη υπερέκφραση ή υποέκφραση φαίνονται στον Πίνακα 1. Για τις στήλες στις οποίες δεν αναγράφεται συγκεκριμένο γονίδιο πρόκειται για Expressed Sequence Tags (ESTs). Τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση κατά 5,9 φορές την παρουσίασε το γονίδιο *TAGLN*. Το γονίδιο με τη δεύτερη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 5,7 φορές ήταν το *LOC100133565* (το οποίο πλέον έχει αντικατασταθεί από το *LOC728688*) (GenBank). Το γονίδιο με την τρίτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,7 φορές ήταν το *THBS1*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, τη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4,4 φορές είχε το γονίδιο *IDI*. Τη δεύτερη και την τρίτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,9 και 2,8 φορές αντίστοιχα παρουσίασαν δύο διαφορετικά μεταγραφήματα το γονιδίου *AURKA*. Την τέταρτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,7 φορές παρουσίασε το γονίδιο *TYMS*.

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επωάστηκαν για 24 ώρες με το εκχύλισμα

από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 187 γονίδια και υποεκφράστηκαν 296 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Όλα τα γονίδια και η αντίστοιχη υπερέκφραση ή υποέκφραση φαίνονται στον Πίνακα 2. Για τις στήλες στις οποίες δεν αναγράφεται συγκεκριμένο γονίδιο πρόκειται για Expressed Sequence Tags. Τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση κατά 12,9 φορές την παρουσίασε το γονίδιο *LOC100132564*. Το γονίδιο με τη δεύτερη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 6,8 φορές ήταν το *LOC100008588*. Το γονίδιο με την τρίτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 6,4 φορές ήταν το *LOC100133565*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν τη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4,2 φορές είχε το γονίδιο *HOXD1*. Τη δεύτερη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4 φορές είχε το γονίδιο *HAMP*. Την τρίτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,8 φορές είχε το γονίδιο *ID1*.

Όσον αφορά τη σύγκριση στην επίδραση που είχε το εκχύλισμα βόστρυχου στη γονιδιακή έκφραση των καρκινικών ηπατικών κυττάρων ανάμεσα στις 4 και τις 24 ώρες επώασης υπήρχαν 98 γονίδια που υπερεκφράστηκαν και 88 γονίδια που υποεκφράστηκαν και στις δύο περιπτώσεις.



Εικόνα 6. Αριθμός γονιδίων που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μάρτυρες, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 μετά από επώαση για 4 και 24 ώρες με το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης.



Εικόνα 7 Αριθμός κοινών γονιδίων που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν σε σύγκριση με τις καλλιέργειες μάρτυρες, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 μετά από επώαση για 4 και 24 ώρες με το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης.

Πίνακας 4. Γονίδια που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν (-) στις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα βόστρυχου και διαφορά στην έκφρασή τους.

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
TAGLN	5,92	LOC401098	2,96	LOC100131718	2,74
LOC100133565	5,66	LOC100131857	2,92	DLC1	2,73
THBS1	4,69	AURKA	-2,91	CHRNA5	2,72
LOC100132564	4,58	LOC728903	2,91	ZNF682	2,71
ID1	-4,40	LOC100129269	2,91	TYMS	-2,71
FST	4,20	ATF3	2,88	GPAM	-2,71
ACTA1	4,16	C10orf10	2,88	FST	2,70
KLF6	4,11	FCAR	2,87	AKAP12	2,70
	4,09	LOC648852	2,86	LOC100130516	2,69
KIAA0251	4,04	LOC100008588	2,84	FLJ36131	2,69
TAGLN	3,89		2,84	PRO0628	2,69
	3,70		2,84	DTWD2	2,68
	3,69	TDP1	2,84	GDF15	2,68
LDLR	3,69	SHROOM4	2,83	XRCC2	2,68
LOC654342	3,64	IL8	2,83		2,67
C8orf4	3,64	AURKA	-2,82	ZC3H12A	2,66
KLF6	3,62	LOC100132391	2,82	ICAM1	2,66
DUSP8	3,45	FSTL3	2,81	LOC389765	2,65
MGC16384	3,38	MAFF	2,81	CEBPA	-2,64
BEGAIN	3,25	SEMA3E	2,80	RASSF6	2,64
LOC648256	3,08	FAM63A	2,80	LOC100128098	2,64
KIAA1751	3,03	CYR61	2,79	PTP4A2	2,63
LMOD3	3,00	LOC100129211	2,76	NLRP8	2,63
MIR21	2,99	DEM1	2,76	MYO3B	2,63
LRRFIP1	2,98	ZNF483	2,74	TNFSF15	2,63

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
HNRNPU	2,98	LOC401098	2,97	ZNF738	2,62
	2,62	LOC728779	2,52	KLF6	2,46
ZNF577	2,62	PTGR2	2,52	CCL20	2,46
PAH	-2,61	LOC653489	2,51	GBP1	2,46
BIRC3	2,61	DKK1	-2,51	BLZF1	2,45
WDR74	2,60	FLJ40722	2,51		2,44
MIR1974	2,60	LOC645452	2,50	SPTLC1	2,44
FOXA1	-2,60	CCDC34	-2,50	CXCL2	2,44
UBE2C	-2,60	FLJ42393	2,50	ATXN2L	2,43
LOC100128126	2,59	RASD1	2,50	SYAP1	2,43
CCNA2	-2,58	PLIN5	2,49	PPA2	2,43
C1orf131	-2,57	PCNA	-2,49	C15orf52	2,43
LOC100133516	2,57	C8orf45	2,49		2,42
LOC441763	2,57	SGK	2,49	GSTTP2	2,42
FAM175A	2,57	FEN1	-2,49	RFC4	-2,42
RHBDF1	2,56	KANK4	-2,49	MCART1	2,42
KLHL28	2,56	CSF2RA	2,48		2,42
PDLIM5	2,56	LRRC37B2	2,48	LOC728452	2,41
TMEM106A	2,56	C14orf153	2,48	GRIPAP1	2,41
MAD2L1	-2,55	CCBE1	2,48	HIATL2	2,40
HSPC268	2,55	LOC653226	-2,48	LOC255167	2,40
C11orf63	2,55	PRAGMIN	2,47	DENR	2,39
ALPP	2,54	FAM73A	2,47	TGFBR2	2,39
ID3	-2,54	CAT	-2,47	ICA1	2,38
LOC90586	2,54	CCDC34	-2,47	ZNF14	2,38
CCDC125	2,54	CKS1B	-2,47	LOC100129502	2,38
LOC100132585	2,53	CYCSL1	2,47	LOC100130835	2,37
LOC100128288	2,53	SSTR2	2,46	LOC652226	2,37

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
PRDX3	-2,37	CSF2RA	2,33	FLJ44124	2,27
KIAA0101	-2,36	GPR1	2,32	IL17RD	2,27
TMEM14A	-2,36	EID2B	2,32	RNU4ATAC	2,26
	2,36	C15orf63	2,32	NFKBIA	2,26
ZNF786	2,36	DDX51	2,31	VAV3	-2,26
TOP2A	-2,36	FLJ25363	2,31	NFKB2	2,26
LOC123688	2,36	SCARNA9	2,30	LOC100128510	2,26
LOC148915	-2,35	TNFSF14	2,30	LOC100130053	2,25
C2orf69	2,35	CKS1B	-2,30	PCDHB9	2,25
SNORA84	2,35	MBD4	2,30	LOC730990	2,25
TDRD1	2,35	YRDC	2,30	QRFPR	2,25
LEP	2,35	C21orf58	2,30	SLC35E1	2,24
UBE2C	-2,35	ATXN2L	2,29	TDRD1	2,24
GSTA1	-2,34	ZNF69	2,29	ZCCHC9	-2,24
N4BP2	2,34	HSD17B7	2,29	CDO1	-2,24
C6orf170	2,34	KIF20A	-2,29	MGC26718	2,24
SNAPC1	2,34	PTPLAD2	2,28	CKS2	-2,24
FKBP14	2,34	FAM83D	-2,28	HMG2	-2,24
MBTD1	2,34	CAMTA1	2,28	RHBDL2	2,24
CACYBP	-2,34	LMNB1	-2,28	IDH1	-2,24
LOC100133950	2,33	SMC4	-2,28	DUSP19	2,23
DUXAP3	2,33	POLR2J4	2,28	VPS41	2,23
CATSPER2	2,33	LOC100128084	2,27	PPM1K	2,23
LOC644852	2,33	RCAN1	2,27	ITGA2	2,23
ZNF652	2,33	CDC2	-2,27	RAD51C	-2,23
ZNF669	2,33	DAPK3	2,27	SNRPF	-2,23
	2,33	OCIAD1	2,27	SNORA28	2,22

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
SDC4	2,22	KRT17	2,19	LOC100132727	2,15
PIP5K2B	2,22	C16orf75	-2,19	LOC730417	2,15
LOC647389	2,22	HRSP12	-2,19	NFKBIZ	2,15
DNAJC9	-2,22	FUT6	2,19	SMTN	2,15
COX17	-2,21	LOC729513	2,19	IER3	2,15
CRCP	2,21	LOC100128266	-2,18	SLBP	-2,15
LOC100134053	2,21	C3orf34	2,18	UBE2T	-2,15
ZNF394	2,21	ARF4	-2,18	PIGY	-2,15
LOC729964	-2,21	NDUFB6	-2,18	SMCR5	2,15
C7orf23	-2,21	LOC645452	2,17	ACOX2	-2,15
UNG	-2,21	PNPT1	2,17	LOC134997	-2,15
IDH1	-2,21	VSNL1	-2,17	RNF19A	2,15
BOLA3	-2,21	LOC730993	2,17	ARL16	2,15
HM13	2,21	ANKRD44	2,17	LOC100134241	2,15
DST	2,21	C20orf30	-2,17	LOC100131989	2,15
LOC729120	2,21	LOC644250	2,17	MCEE	-2,15
HAMP	-2,20	C8orf37	2,17		2,14
CENPA	-2,20	GCSH	-2,16	GDPD1	2,14
DMC1	2,20	LOC729679	-2,16	RWDD1	-2,14
ITPRIPL2	2,20	CCNB2	-2,16	HMGB2	-2,14
FLJ38717	2,20	BLZF1	2,16	BRIX1	-2,14
IL10	2,20		2,16		2,14
FAM40B	2,20	ID2	-2,16	LOC728873	-2,14
RRM2	-2,20	LOC646786	2,16	MAGOH	-2,13
SLC5A8	2,20	C1orf53	-2,16	CPN2	-2,13
MAGT1	2,19	DCK	-2,16	TPM2	2,13
PHAX	2,19	LOC729082	-2,16	LOC730060	2,13

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
BIRC3	2,13	RAD51AP1	-2,12	MRPL13	-2,09
PSMD10	-2,13	LOC648921	2,11	NIF3L1	-2,09
MPHOSPH10	-2,13	TMEM126A	-2,11	PXMP2	-2,08
LOC100129094	2,13	RAX2	2,11	GBP1	2,08
FLRT3	2,13	LOC100128062	2,11	PPP1R3C	-2,08
KIAA0408	2,13	GBP2	2,11	AKAP12	2,08
GPAM	-2,13	FABP5	-2,11	BOLA3	-2,08
DKFZp761P0423	2,13	POFUT1	2,11	PPP1R15A	2,08
ANKRD30B	2,13	TRMT5	-2,11	LOC730313	2,08
RAPGEF1	2,13	PRRG4	2,11	LOC100130598	2,08
PRO1853	2,13	NDUFB3	-2,11	PLA2G2D	2,08
EBPL	-2,12	FOXQ1	-2,10	COMMD8	-2,07
	2,12	TNFRSF12A	2,10	EHHADH	-2,07
AFMID	-2,12	RBPM5	2,10	DISC1	2,07
RFC3	-2,12	INADL	2,10	C7orf54	2,07
ZNF486	2,12	FLJ46309	2,10	SGK1	2,07
C13orf37	-2,12	LOC440704	2,10	ACADM	-2,07
LOC392437	-2,12	GEMIN6	-2,10	HCG2P7	2,07
LOC651309	2,12	C10orf32	-2,10	NUBPL	2,07
EXOSC8	-2,12	LOC730534	-2,10	LOC100127975	2,06
IL8	2,12	NUDT21	-2,09	ARHGEF3	-2,06
RCN2	-2,12	LOC100129362	2,09	TMEM14D	-2,06
RPL23AP13	2,12	GSTA2	-2,09	SLC4A5	2,06
CREB1	2,12	LOC641844	-2,09	TCIRG1	2,06
SSB	-2,12	LOC100130367	2,09	SLC25A20	2,06
C9orf80	2,12	RBM3	2,09	TOMM5	-2,06
PRDX3	-2,12	LOC100130276	2,09	C14orf82	2,06

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
VBP1	-2,06	ARL5A	-2,05	SMC3	-2,02
SNORD12C	2,06	SP5	-2,05	STAG3L2	2,02
TRIM13	2,06	GALNT3	2,05	MAFF	2,02
LOC100131541	2,06	CXXC5	-2,05	PSMA5	-2,02
	-2,06	SEPX1	-2,05	LOC644670	2,02
TFAM	-2,06	STMN1	-2,04	RAE1	-2,02
EDN1	2,06	LYAR	-2,04	LOC100132740	2,02
LOC653086	2,06	SGK1	2,04	DAPP1	2,02
LOC653829	2,06	DEK	-2,04	LOC100130707	-2,02
PPM1B	2,06	FLJ10213	2,04	MGC3020	2,02
BMS1P5	2,06		2,04	LOC727803	-2,02
LOC727761	-2,06	SOX18	-2,04	C21orf24	2,02
LSM5	-2,06	TMEM17	2,04	LOC728499	2,02
LOC648526	2,05	EGR1	2,04	TFG	-2,02
SGCE	-2,05	FAM96A	-2,04	LOC642975	-2,02
LOC100130445	2,05	HM13	2,04	C7orf55	-2,01
KCTD3	-2,05	LOC653505	-2,03	CXXC5	-2,01
LOC100133772	2,05	PSMG1	-2,03	LOC653352	2,01
LOC440063	-2,05	SKP2	-2,03	IL4R	2,01
SKP2	-2,05	GLRX3	-2,03	PPM1H	-2,01
CCDC115	-2,05	GGCT	-2,03	LOC647302	-2,01
SNORA12	2,05	SNORD8	2,03	LOC728620	2,01
	2,05	VCL	2,03	PPAT	-2,01
LOC158301	2,05	ALG13	-2,03	POLE3	-2,01
GNG10	-2,05	SERPINE1	2,02	OIP5	-2,01
ASF1A	-2,05	LOC100129086	-2,02	ALDH3A2	-2,01
	2,05	GPR125	2,02	LOC400446	2,01

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
ZYX	2,01
LOC400713	2,01
FAM119A	2,01
LOC727908	2,01
ProSAPiP1	2,01
UHRF1	-2,00
SAPS2	2,00
UQCRFS1	-2,00
CALD1	2,00
CPN2	-2,00
C16orf53	-2,00

Πίνακας 5. Γονίδια που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν (-) στις 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα βόστρυχου και διαφορά στην έκφρασή τους.

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
LOC100132564	12,95		3,28	APOC3	-2,86
LOC100008588	6,78	KLF6	3,24	NR1H4	-2,85
LOC100133565	6,41	MIR1974	3,23	DIO1	-2,85
BEGAIN	6,20	DKK1	-3,23	MCM4	-2,82
ITGA2	5,70	ANKRD38	-3,22	AURKA	-2,82
ANGPTL4	4,59	MIXL1	-3,21	RPS6KA3	-2,82
F2RL1	4,25	GCNT3	3,17	UNG	-2,82
LOC441763	4,24	LDLR	3,17	NKD1	-2,81
HOXD1	-4,21	KLF15	3,15	AURKA	-2,80
F2RL1	4,12	ACTA1	3,11	LOC100132391	2,80
	4,09	KANK4	-3,09	SPP1	-2,79
HAMP	-4,02	IL4R	3,04	SEMA3E	2,78
CPXM1	3,94	LOC100008589	3,04	EID2B	2,78
AKAP12	3,85	DDC	-3,01	EGR1	2,77
AKAP12	3,84	LGALS1	3,01	RAB3B	2,76
FSTL3	3,84	GINS2	-3,01	TYMS	-2,74
ID1	-3,82	CPB2	-3,00	IDH1	-2,74
SDC4	3,73	HADH	-2,98	SMC4	-2,74
TRPV2	3,73	PAH	-2,98	CCNA2	-2,72
GDF15	3,71	MOSC1	-2,97	AKR1D1	-2,72
EMP3	3,57	GSTA1	-2,97	MCM3	-2,72
	3,52	ADM	2,96	MT2A	2,71
SERPINE1	3,52	KLF6	2,95	PPM1H	-2,71
KLF6	3,51	DIO1	-2,94	SNX5	-2,70
KIAA0101	-3,51	CYR61	2,94	GSTA1	-2,70
TAGLN	3,49	UHRF1	-2,92	SEPP1	-2,69
GPAM	-3,39	CPB2	-2,90	LOC729779	-2,69

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
PECR	-2,68	RNU1-5	2,56	UBE2C	-2,43
IL8	2,67	FBXO5	-2,56	PPP1R3C	-2,43
SKP2	-2,67	SP5	-2,55	DUSP1	2,43
C13orf15	2,66	LIME1	-2,55	TFDP1	-2,43
FEN1	-2,65	CAT	-2,54	LOC728809	2,43
RASD1	2,65	NAP1L4	-2,53	RFX5	-2,42
IRX3	-2,65	MAD2L1	-2,53	MCEE	-2,42
PCNA	-2,65	HEPACAM	-2,53	FAM83D	-2,41
STMN1	-2,64	PBK	-2,52	LGALS2	-2,41
GSTA1	-2,64	CCBE1	2,52	LOC100132585	2,40
ALDH6A1	-2,63	C1orf131	-2,51	SPRY1	-2,40
GPAM	-2,63	RNU4-2	2,50	LRRFIP1	2,39
SSB	-2,62	LEAP2	-2,49	CCNB2	-2,39
NCAPG	-2,62	ZNF682	2,48	LOC647307	-2,39
MCM2	-2,62	ZNF394	2,48	TIMP1	2,38
SLC16A10	-2,62	FLJ36131	2,47	LOC441087	2,38
C16orf75	-2,61	CCND1	-2,47	RFC4	-2,38
CDCA5	-2,61	AGPAT9	2,47	LOC642412	2,38
RRM1	-2,60	ATAD2	-2,46	MAL2	-2,38
IL11	2,59	HMGB2	-2,46	TRMT5	-2,38
TDP1	2,59	GSTA2	-2,45	DDX51	2,37
SHROOM4	2,58	KIF20A	-2,45	FAM175A	2,37
SLC22A11	2,57	CDC45L	-2,44	PRIM1	-2,37
ZMAT3	2,57	RRM2	-2,44	BRP44L	-2,37
HOXB6	2,57	LMNB1	-2,44	HSPC268	2,37
DST	2,57	RN5S9	2,44	PRDX3	-2,37
KIF20B	-2,56	CMBL	-2,44		2,37
IDH1	-2,56	MAP1B	2,43	ARL5A	-2,37

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
SULT2A1	-2,37	PPP1CC	-2,33		2,29
SHMT1	-2,36	DUSP19	2,33	ACSL5	2,29
C3orf34	2,36	PDZK1	-2,33	TAGLN	2,29
CDKN2AIPNL	2,36	MERTK	-2,33	ADH6	-2,29
RNASE4	-2,36	SEPHS1	-2,33	TCFL5	-2,28
LOC727882	2,36	MAGED1	-2,32	KRT19	2,28
AKAP12	2,36	CCDC34	-2,32	BRX1	-2,28
PPP1R15A	2,36	MCM7	-2,32	HMG2	-2,28
LOC148915	-2,35	NDUFB6	-2,32	CATSPER2	2,28
	-2,35	LOC730534	-2,32	ZNF577	2,28
ITPR3	2,35	RHBDF1	2,32	S100A6	2,28
RNU1-3	2,35	IL17B	2,32	KIAA0251	2,28
FZD4	-2,35	MXRA8	2,32	LOC100130516	2,28
DTNA	2,35	KIAA1751	2,31	RHBDF2	2,28
NUSAP1	-2,35	DUSP9	-2,31	PRDX3	-2,28
LOC728903	2,35	CEBPA	-2,31	TMEM2	2,28
GLUD1	-2,35	SPRY1	-2,31	HRSP12	-2,27
LOC728554	-2,35	LOC100128098	2,30	C19orf28	2,27
LOC100128288	2,35	CENPA	-2,30	LOC285733	-2,27
NCAPD2	-2,35	LOC729816	-2,30	H2AFZ	-2,27
TCEA3	-2,34	IGFBP3	2,30	TIMP2	2,27
	2,34	TMBIM1	2,30	AGBL5	-2,27
ODAM	-2,34	RFC4	-2,30	ESAM	2,26
LOC730417	2,34	H2AFY2	-2,30	HMMR	-2,26
CREB1	2,34	LOC648210	-2,30	AIF1L	-2,26
S100A3	2,34	JUN	2,30	FCAR	2,26
AVPI1	-2,34	MAGED1	-2,30	ENPP3	-2,26

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
LOC648852	2,33	CHRNA5	2,29	LRAP	2,25
QRFPR	2,25	PRAGMIN	2,21	PRIM1	-2,18
RPA3	-2,25	ENO2	2,21	NSMCE4A	-2,18
UBE2T	-2,25	RNU1G2	2,21	SH2D5	2,17
TK1	-2,25		2,21	MCART1	2,17
XRCC2	2,25	CPB2	-2,21	LOC643031	2,17
ERP27	-2,24	RAD51C	-2,20	PLK4	-2,17
TMEM17	2,24	TMEM14A	-2,20	LOC730313	2,17
ARL16	2,24	LOC729090	2,20	LOC731314	-2,17
C14orf153	2,24	NDUFB6	-2,20	SNHG7	-2,17
C18orf56	-2,24	C1orf115	-2,20	DNAJC9	-2,17
GSTM1	-2,23	CDK2	-2,20	LOC100129362	2,17
MYPOP	-2,23	LOC100129269	2,20	CADM1	-2,17
LOC729926	-2,23	LOC255167	2,20	LEO1	-2,16
NUP37	-2,23	DEM1	2,20	LOC401098	2,16
PRC1	-2,23	AURKB	-2,20	LOC647169	-2,16
HNRNPA0	-2,23	GRIPAP1	2,19	MTHFD2	-2,16
CDK6	-2,23	CKS1B	-2,19	HMGNI	-2,16
VAV3	-2,23	FAM96A	-2,19	NUDT21	-2,16
ALDH1A1	-2,23	KCTD3	-2,19		-2,16
IGFBP1	2,22	CDA	2,19	LOC641844	-2,16
CKS1B	-2,22	BIRC5	-2,19	PRKAG2	2,16
C19orf48	-2,22	MYO5C	-2,19	TPX2	-2,15
PSAT1	-2,22	NIF3L1	-2,19	S100A16	2,15
CRCP	2,22	PAQR8	-2,18	SLC25A42	-2,15
CTSB	2,22	NEU4	-2,18	SPTLC3	-2,15
ZNF14	2,22	FAM117B	-2,18	MELK	-2,15

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
BMS1P5	2,22	MDH1	-2,18	UPP1	2,15
ST13	-2,22	EPHX2	-2,18	E2F2	-2,15
HCG2P7	2,14	RGN	-2,12	CTSB	2,10
TNFRSF19	-2,14	DMC1	2,12	NOS3	2,10
CRLS1	-2,14	CDC14B	-2,12	RWDD1	-2,10
TTC39C	-2,14	SEMA4B	2,12	EHHADH	-2,10
DBI	-2,14	RHBDF2	2,12	SUOX	-2,10
CA5A	-2,14	C8orf45	2,12	RN7SK	2,10
MT1A	2,14	TFAM	-2,11	MERTK	-2,10
DEK	-2,14	ARID5B	-2,11	HNMT	-2,10
ITPRIP	2,14	HIATL2	2,11	FOXA1	-2,10
QSOX1	2,14	CENPN	-2,11	SOX4	2,09
NAP1L1	-2,13	LOC645452	2,11	SPTLC3	-2,09
LSM5	-2,13	PAICS	-2,11	MXRA8	2,09
TOMM20	-2,13	LOC727803	-2,11	CKS2	-2,09
OIP5	-2,13	RBMX	-2,11	B3GNT6	-2,09
SORBS2	-2,13	ACOX2	-2,11	LOC100132938	2,09
	2,13	SKP2	-2,11	LOC642975	-2,08
SQSTM1	2,13	PLAGL2	-2,11	AP3B1	-2,08
CETN2	-2,13	LOC100132992	-2,11	POFUT1	2,08
DIO1	-2,13	VSNL1	-2,11	BIRC3	2,08
FAM63A	2,13	LOC90586	2,11	C13orf37	-2,08
LOC389765	2,12	KIFC1	-2,11	L1CAM	2,08
IRF2BP2	-2,12	PIGY	-2,11	SERPINA7	-2,08
HNRNPU	2,12	AGXT	-2,10	SNX5	-2,08
LOC653506	2,12	ZNF549	2,10	CLIC4	-2,08
TFDP1	-2,12	RPA1	-2,10	C14orf85	2,08

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
PRDX6	-2,12	ZNF362	-2,10	KCTD3	-2,08
MCM6	-2,12	ZCCHC14	-2,10	NEDD4L	-2,08
ITPRIPL2	2,12	CD79B	2,10	PAICS	-2,08
RN7SK	2,08	TMEM170B	-2,05	DHX40	-2,03
ZNHIT3	-2,07	NFE2	-2,05	HMMR	-2,03
TAGLN2	2,07	DGAT1	-2,05	ZNF69	2,03
C15orf63	2,07	REEP6	-2,05	LOC389156	-2,03
ALDH18A1	-2,07	ACADM	-2,05	DONSON	-2,03
RPA1	-2,07	CKAP2L	-2,05	CCNG1	-2,03
LMOD3	2,07	CCDC117	-2,05	POLR2F	-2,03
FMO5	-2,07	CCDC59	-2,05	GGCT	-2,03
SPON2	2,06	SCARNA16	2,05	RAD51AP1	-2,03
BLZF1	2,06	TUBB	-2,05	ISCU	-2,03
GCSH	-2,06	LOC728620	2,04	MED30	-2,03
AFMID	-2,06	PXMP2	-2,04	LOC653381	-2,03
RSL24D1	-2,06	JAG1	2,04	RPS26P11	-2,03
ALDH7A1	-2,06	PUS10	-2,04	RBL2	-2,03
SIVA1	-2,06	CSE1L	-2,04	KLHL28	2,03
PIPOX	-2,06	LOC100128410	-2,04	MRPS9	-2,02
MGC16384	2,06	DKFZp761P0423	2,04	DNMT1	-2,02
TINP1	-2,06	ANTXR2	2,04	RCN2	-2,02
KIF11	-2,06	SMAP2	-2,04	SNORD48	2,02
C14orf106	-2,06	LSM3	-2,04	RPL21	-2,02
MTHFD2	-2,06	WSB1	2,04	KLHDC2	-2,02
ATPAF1	-2,06	HSD17B4	-2,04	RPS26L	-2,02
DBN1	2,06	UGT2A3	-2,04	DHCR7	2,02
CLDN6	2,06	ASF1B	-2,04		2,02

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης	Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
C2orf64	-2,06	ID3	-2,04	ICAM1	2,02
UGT2B10	-2,06	MIR1978	2,04	RILPL2	-2,02
AUH	-2,05	CDC20	-2,04	UBE2C	-2,02
NLRP8	2,05	VGF	2,04	ZNF652	2,02
CDC25B	-2,02	HEY1	-2,00		
LANCL1	-2,01	DST	2,00		
POLE3	-2,01	LOC100131205	-2,00		
IL17RD	2,01	DLGAP5	-2,00		
CABC1	-2,01	C8A	-2,00		
PLXNA3	2,01	LOC100129211	2,00		
RPS6KA3	-2,01				
LOC654342	2,01				
CD276	2,01				
HMGB2	-2,01				
LOC647886	-2,01				
SUCLG1	-2,01				
ZNF430	2,01				
SIN3A	-2,01				
IL32	2,01				
SNRPF	-2,01				
RPL13A	-2,01				
RACGAP1	-2,01				
ECHS1	-2,01				
LOC730278	2,01				
PPAT	-2,00				
LOC651309	2,00				
LOC729082	-2,00				

Γονιδιακά δίκτυα και κυτταρικές λειτουργίες που επηρεάστηκαν από τα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβλήθηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό 'PANTHER' (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) έδειξε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου ανήκαν στα γονιδιακά μονοπάτια που φαίνονται στους Πίνακες 6 & 7.

Πίνακας 6. Γονιδιακά μονοπάτια στα οποία ανήκαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 4 h επώασης.

Pathways	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed4h.txt			
	#	Observed	expected	+/-	P value
p53 pathway	113	7	1,76	+	2,18E-03
DNA replication	21	3	0,33	+	4,53E-03
Apoptosis signaling pathway	123	6	1,92	+	1,34E-02
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	283	9	4,41	+	3,50E-02
De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis	19	2	0,3	+	3,59E-02
p53 pathway feedback loops 2	52	3	0,81	+	4,86E-02

Πίνακας 7. Γονιδιακά μονοπάτια στα οποία ανήκαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 24 h επώασης.

Pathways	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed24h.txt			
	#	observed	expected	+/-	P value
Methylmalonyl pathway	4	3	0,08	+	8,09E-05
p53 pathway	113	9	2,27	+	5,57E-04
Succinate to propionate conversion	2	2	0,04	+	7,84E-04
DNA replication	21	4	0,42	+	9,33E-04
Salvage pyrimidine deoxyribonucleotides	4	2	0,08	+	3,05E-03
Serine glycine biosynthesis	5	2	0,1	+	4,71E-03
TCA cycle	17	3	0,34	+	5,12E-03
5-Hydroxytryptamine biosynthesis	6	2	0,12	+	6,69E-03
De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis	19	3	0,38	+	6,94E-03
Cell cycle	22	3	0,44	+	1,03E-02
Formyltetrahydroformate biosynthesis	11	2	0,22	+	2,11E-02
De novo purine biosynthesis	34	3	0,68	+	3,20E-02
Salvage pyrimidine ribonucleotides	14	2	0,28	+	3,28E-02
Oxidative stress response	60	4	1,21	+	3,40E-02
Pyrimidine Metabolism	15	2	0,3	+	3,72E-02
PLP biosynthesis	2	1	0,04	+	3,94E-02
Histamine synthesis	2	1	0,04	+	3,94E-02
Interleukin signaling pathway	161	7	3,23	+	4,60E-02

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό ‘PANTHER’ έδειξε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου επηρεάζουν βιολογικές διαδικασίες που φαίνονται στους Πίνακες 8 & 9.

Πίνακας 8. Βιολογικές διαδικασίες που επηρεάζονται από τα γονίδια των οποίων η έκφραση άλλαξε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 4 h επώασης.

Biological Process	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed4h.txt			
	#	observed	expected	+/- ^Δ	P value
cell cycle	1840	50	28,65	+	8,21E-05
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3825	85	59,55	+	2,81E-04
cellular process	6258	126	97,43	+	3,81E-04
primary metabolic process	7950	150	123,78	+	1,54E-03
mitosis	635	20	9,89	+	2,58E-03
metabolic process	8267	153	128,71	+	3,21E-03
chromosome segregation	206	9	3,21	+	5,52E-03
response to interferon-gamma	105	6	1,63	+	6,51E-03
meiosis	192	8	2,99	+	1,13E-02
protein transport	1646	15	25,63	-	1,36E-02
intracellular protein transport	1646	15	25,63	-	1,36E-02
transport	2857	31	44,48	-	1,46E-02
oxygen and reactive oxygen species metabolic process	63	4	0,98	+	1,76E-02
nitrogen compound metabolic process	64	4	1	+	1,86E-02
endocytosis	575	3	8,95	-	2,06E-02
intracellular signaling cascade	1568	35	24,41	+	2,07E-02
response to stimulus	1798	39	27,99	+	2,24E-02
sex determination	15	2	0,23	+	2,33E-02
response to stress	500	14	7,78	+	2,65E-02
coenzyme metabolic process	107	5	1,67	+	2,71E-02
immune system process	2628	53	40,92	+	2,91E-02
cell-cell adhesion	799	6	12,44	-	3,32E-02
natural killer cell activation	121	5	1,88	+	4,23E-02
apoptosis	966	22	15,04	+	4,99E-02

Πίνακας 9. Βιολογικές διαδικασίες που επηρεάζονται από τα γονίδια των οποίων η έκφραση άλλαξε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 24 h επώασης.

Biological Process	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed24h.txt			
	#	Observed	expected	+/-	^Δ P value
cell cycle	1840	81	36,96	+	1,70E-11
metabolic process	8267	227	166,08	+	6,25E-10
primary metabolic process	7950	217	159,71	+	5,10E-09
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3825	115	76,84	+	2,70E-06
cellular amino acid and derivative metabolic process	367	22	7,37	+	7,66E-06
carbohydrate metabolic process	952	37	19,13	+	1,22E-04
mitosis	635	27	12,76	+	2,63E-04
tricarboxylic acid cycle	32	5	0,64	+	5,28E-04
chromosome segregation	206	12	4,14	+	1,13E-03
cellular process	6258	155	125,72	+	1,14E-03
oxygen and reactive oxygen species metabolic process	63	6	1,27	+	1,91E-03
meiosis	192	11	3,86	+	2,04E-03
generation of precursor metabolites and energy	351	16	7,05	+	2,34E-03
protein transport	1646	19	33,07	-	4,35E-03
intracellular protein transport	1646	19	33,07	-	4,35E-03
coenzyme metabolic process	107	7	2,15	+	6,45E-03
neurological system process	1954	25	39,25	-	7,54E-03
exocytosis	414	2	8,32	-	1,02E-02
lipid metabolic process	1119	34	22,48	+	1,16E-02
response to stress	500	18	10,04	+	1,37E-02
transport	2857	42	57,4	-	1,41E-02
cell surface receptor linked signal transduction	2235	32	44,9	-	2,11E-02
sensory perception	708	7	14,22	-	2,60E-02
visual perception	412	3	8,28	-	3,38E-02
organelle organization	328	12	6,59	+	3,56E-02
intracellular signaling cascade	1568	42	31,5	+	3,58E-02
system process	2216	33	44,52	-	3,59E-02
nitrogen compound metabolic process	64	4	1,29	+	4,14E-02
cell-cell signaling	1331	18	26,74	-	4,37E-02
establishment or maintenance of chromatin architecture	302	11	6,07	+	4,42E-02
synaptic transmission	594	6	11,93	-	4,52E-02
response to toxin	97	5	1,95	+	4,77E-02

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό 'PANTHER' έδειξε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάστηκε από το εκχύλισμα βόστρυχου επηρεάζουν μοριακές λειτουργίες που φαίνονται στους Πίνακες 10 & 11.

Πίνακας 10. Μοριακές λειτουργίες που επηρεάζονται από τα γονίδια των οποίων η έκφραση άλλαξε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 4 h επώασης.

Molecular Function	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed4h.txt			
	#	Observed	expected	+/-	▲ P value
binding	6751	147	105,11	+	6,11E-07
nucleic acid binding	3863	83	60,14	+	9,82E-04
protein binding	3157	70	49,15	+	1,22E-03
DNA-directed DNA polymerase activity	35	4	0,54	+	2,35E-03
hydrolase activity, acting on ester bonds	667	19	10,38	+	9,17E-03
tumor necrosis factor receptor binding	11	2	0,17	+	1,31E-02
catalytic activity	5336	101	83,08	+	1,39E-02
RNA binding	530	15	8,25	+	2,04E-02
cytoskeletal protein binding	396	12	6,17	+	2,28E-02
enzyme activator activity	146	6	2,27	+	2,80E-02
kinase activator activity	109	5	1,7	+	2,90E-02
chromatin binding	189	7	2,94	+	3,00E-02
kinase regulator activity	320	10	4,98	+	3,00E-02
hydrolase activity	2236	46	34,81	+	3,09E-02
phosphatase activity	241	8	3,75	+	3,68E-02
kinase inhibitor activity	122	5	1,9	+	4,35E-02
DNA polymerase processivity factor activity	3	1	0,05	+	4,56E-02

Πίνακας 11. Μοριακές λειτουργίες που επηρεάζονται από τα γονίδια των οποίων η έκφραση άλλαξε από το εκχύλισμα βόστρυχου μετά από 24 h επώασης.

Molecular Function	Homo sapiens genes (REF)	GenesDiffExpressed24h.txt			
	#	observed	expected	+/-	▲ P value
catalytic activity	5336	155	107,2	+	1,31E-07
transferase activity	1593	58	32	+	8,98E-06
oxidoreductase activity	703	31	14,12	+	4,84E-05
binding	6751	172	135,62	+	9,69E-05
DNA-directed RNA polymerase activity	52	6	1,04	+	7,25E-04
nucleic acid binding	3863	104	77,61	+	7,72E-04
protein binding	3157	84	63,42	+	3,91E-03
isomerase activity	189	10	3,8	+	5,52E-03
DNA helicase activity	82	6	1,65	+	6,78E-03
racemase and epimerase activity	61	5	1,23	+	8,31E-03
hydro-lyase activity	61	5	1,23	+	8,31E-03
hydrolase activity	2236	61	44,92	+	8,71E-03
transaminase activity	25	3	0,5	+	1,45E-02
enzyme inhibitor activity	359	14	7,21	+	1,52E-02
helicase activity	159	8	3,19	+	1,63E-02
acyltransferase activity	193	9	3,88	+	1,74E-02
peroxidase activity	27	3	0,54	+	1,77E-02
antioxidant activity	29	3	0,58	+	2,13E-02
phosphatase activity	241	10	4,84	+	2,56E-02
DNA-directed DNA polymerase activity	35	3	0,7	+	3,44E-02
DNA binding	2416	61	48,54	+	3,66E-02
G-protein coupled receptor activity	473	4	9,5	-	3,86E-02
cation transmembrane transporter activity	402	3	8,08	-	3,89E-02
chromatin binding	189	8	3,8	+	3,92E-02
microtubule motor activity	66	4	1,33	+	4,54E-02
protein disulfide isomerase activity	17	2	0,34	+	4,65E-02

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του ήπατος είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι αποτελεσματικές καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αμπέλου έχουν αντικαρκινική δράση, αλλά τα εκχυλίσματα αυτά προέρχονται από τον καρπό του φυτού (κυρίως από σπόρους) ενώ λίγες είναι οι δεν υπάρχει σχετικά με την πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους. Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έχει δείχτει ότι εκχυλίσματα βόστρυχων έχουν αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση ενώ αναστέλλουν και την αύξηση καρκινικών κυττάρων από διάφορους καρκινικούς τύπους (Sahrazidou και συν., 2014; Apostolou και συν., 2013). Επίσης, μελέτες του ίδιου εργαστηρίου έδειξαν ότι το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2 μέσω απόπτωσης (Κερμελιώτου 2011). Επιπλέον, το συγκεκριμένο εκχύλισμα είχε και αντι-αγγειογενετική δράση μέσω αναστολής του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα αύξησης (VEGF) (Κερμελιώτου 2011).

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων HepG2 με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η ανασταλτική δράση στην αύξηση αυτών των κυττάρων. Μάλιστα, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με το εκχύλισμα για δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, για 4 και 24 ώρες. Αυτό έγινε γιατί παρατηρήθηκε μικροσκοπικά ότι ήδη από τις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα κύτταρα άλλαζαν μορφολογία και γίνονταν αποπτωτικά. Έτσι, θέλαμε να εξετάσουμε κατά πόσο αλλάζει η γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα HepG2 λόγω της επίδρασης του εκχυλίσματος ανάμεσα στα πρώιμα και σε μεταγενέστερα στάδια αναστολής της κυτταρικής αύξησης. Υπολογίστηκε και το IC50 στην κυτταρική αύξηση μετά από 4 ώρες επώασης και βρέθηκε ότι ήταν 70 μg/ml, παραπλήσιο δηλαδή με το IC50 (80 μg/ml) μετά από 24 ώρες επώασης.

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επωάστηκαν για 4 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 296 γονίδια και υποεκφράστηκαν 151 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση κατά 5,9 φορές την παρουσίασε το γονίδιο *TAGLN*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η τρανστζελίνη, που εκφράζεται κυρίως σε ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα. Γενικά, ο ρόλος της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο δεν είναι γνωστός, ωστόσο πιστεύεται ότι η ελάττωση της έκφρασής της είναι ένας πρώιμος και ευαίσθητος δείκτης για το ξεκίνημα της μεταμόρφωσης πολλών κυτταρικών τύπων σε καρκινικά (GenBank).

Το γονίδιο με τη δεύτερη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 5,7 φορές ήταν το *LOC100133565* (το οποίο πλέον έχει αντικατασταθεί από το *LOC728688*) (GenBank). Στη βάση δεδομένων GenBank θεωρείται ότι είναι ένα ψευδογονίδιο, ωστόσο στη βάση δεδομένων της Celera θεωρείται ότι κωδικοποιεί λειτουργική πρωτεΐνη. Ο ρόλος της πρωτεΐνης (αν πρόκειται για λειτουργική) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LOC100133565* δεν είναι γνωστός, ωστόσο έχει βρεθεί σε cDNA κλώνους από κύτταρα του ήπατος, της σπλήνας αλλά και διαφόρων καρκινικών τύπων (βάση δεδομένων AceView).

Το γονίδιο με την τρίτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,7 φορές ήταν το *THBS1*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η θρομβοσπονδίνη-1, η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων ή των κυττάρων με το εξωκυτταρικό δίκτυο (GenBank). Έχει βρεθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη αναστέλλει την αγγειογένεση επηρεάζοντας την προσκόλληση, την κινητικότητα και την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων (Qin και συν., 2014). Επίσης, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την καρκινογένεση μέσω της αντι-αγγειογενετικής της δράσης (Laklai και συν., 2009).

Το γονίδιο με την πέμπτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,2 φορές ήταν το *FST* (το *LOC100132564* που είχε την τέταρτη μεγαλύτερη υπερέκφραση έχει αφαιρεθεί από τη GenBank). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η φολιστατίνη, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στις γονάδες και αναστέλλει την έκκριση της απελευθερωτικής ορμόνης της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (GenBank). Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται προ-αγγειογενετικός παράγοντας και έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται η έκφραση σε ηπατοκαρκινώματα σαν αντίδραση σε θεραπείες με αντικαρκινικά φάρμακα (Miyahara και συν., 2013).

Το γονίδιο με την έκτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,16 φορές ήταν το *ACTA1*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών της ακτίνης που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα και τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο συνδέονται με διάφορες μυοπάθειες (GenBank). Έχει βρεθεί ότι σε ορισμένους καρκινικούς τύπους (π.χ. σε στοματικούς) μειώνεται η έκφραση αυτού του γονιδίου (Sajjani και συν., 2012).

Το γονίδιο με την έβδομη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,11 φορές ήταν το *KLF6*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων ‘Kruppel-like’ οι οποίες περιέχουν ψευδάργυρο (zinc finger proteins) σαν ένα βασικό στοιχείο των δομικών ενοτήτων τους που συνδέονται με το DNA. Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν συνήθως ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες (GenBank). Έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *KLF6* προκαλεί αναστολή της αύξησης και αποπτωση καρκινικών ηπατοκυττάρων (Diab και συν., 2013).

Το γονίδιο με την ένατη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,04 φορές ήταν το *KIAA0251* (η ακολουθία που είχε την όγδοη μεγαλύτερη υπερέκφραση δεν αντιστοιχεί σε γονίδιο). Το γονίδιο αυτό συμβολίζεται πλέον ως *PDXDC2P*, που θεωρείται ψευδογονίδιο (GenBank).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επώαστηκαν για 4 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου, τη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4,4 φορές είχε το γονίδιο *ID1*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών έλικα-βρόχος-έλικα (HLH) και σχηματίζει ετεροδιμερή με τα κύρια μέλη αυτής της κατηγορίας μεταγραφικών παραγόντων (GenBank). Επειδή η ID1 πρωτεΐνη δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με το DNA, η σύνδεσή της με τα κύρια μέλη της οικογένειας HLH αναστέλλει τη σύνδεση τους με το DNA και τη δράση τους ως μεταγραφικών παραγόντων. Έχει βρεθεί ότι η ID1 πρωτεΐνη χρειάζεται για την αγγειογένεση καρκινικών ξеноμοσχευμάτων σε ποντίκια (Lyden και συν., 1999), και για το λόγο αυτό σε πρόσφατες μελέτες αποτελεί στόχο για αντικαρκινικά φάρμακα (Henke και συν., 2008; Mellick και συν., 2010).

Τη δεύτερη και την τρίτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,9 και 2,8 φορές αντίστοιχα παρουσίασαν δύο διαφορετικά μεταγραφήματα του γονιδίου *AURKA*. Και τα δύο αυτά μεταγραφήματα κωδικοποιούν την ίδια ακριβώς πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη που

κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι η ‘aurora kinase A’ (AURKA), η οποία είναι μία κινάση που η έκφρασή της ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο και εμπλέκεται στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και τη σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου κατά το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, ενώ έχει βρεθεί στο κεντρόσωμα μεσοφασικών κυττάρων και στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου σε μιτωτικά κύτταρα (GenBank). Έχει αναφερθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη παίζει ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης γιατί έχει βρεθεί υπερέκφραση της στο 94% των μεταστατικών περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού (Crane και συν., 2004). Πιστεύεται ότι η υπερέκφραση της AURKA έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται ανευλοειδικά κύτταρα που αποτελεί αιτία στην ανάπτυξη πολλών καρκινικών όγκων. Φυσιολογικά, η έκφραση της AURKA διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Crane και συν., 2004).

Την τέταρτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,7 φορές παρουσίασε το γονίδιο *TYMS*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη θυμιδική συνθετάση. Αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα ένζυμο που έχει ως ρόλο να διατηρεί στα απαραίτητα επίπεδα τη μονοφωσφορική θυμιδίνη για την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA. Η έκφραση αυτού του ενζύμου επάγεται από το μεταγραφικό παράγοντα LSF/TFCP2 ο οποίος δρα ως ογκογονίδιο σε ηπατικά κύτταρα (Yoo και συν., 2010). Γενικότερα, η αναστολή αυτού του ενζύμου αποτελεί στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων (Pela και συν., 2014).

Την πέμπτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,64 φορές παρουσίασε το γονίδιο *CEBPA*. Αυτό το γονίδιο που δεν έχει ιντρόνια κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει μια ‘φερμουάρ λευκίνης’ (leucine zipper) περιοχή και αναγνωρίζει την ακολουθία CCAAT στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων. Η δράση αυτής της πρωτεΐνης επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην ομοίωση του βάρους του σώματος (GenBank). Το γονίδιο αυτό θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος που μπορεί να έχει στην καρκινογένεση του ήπατος. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του μειώνεται σε ηπατοκύτταρα από ογκοπρωτεΐνες (Zhang και συν., 2012), αλλά από την άλλη θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την υπομεθυλίωση και την έκφραση γονιδίων που ενεργοποιούνται στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (Stefanska και συν., 2013).

Την έκτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,61 φορές παρουσίασε το γονίδιο *PAH*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το ένζυμο υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης, του οποίου η έλλειψη οδηγεί στην εμφάνιση της φαινυλκετονουρίας (GenBank). Εκτός από το ρόλο

που παίζει η υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης στη φαινυλκετονουρία, δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για τη σχέση αυτού του ενζύμου με την καρκινογένεση. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η έλλειψη αυτού του ενζύμου οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα φαινυλοξικού οξέος το οποίο έχει αντικαρκινική δράση (Sidell και συν., 1995; Sawatsri και συν., 2001). Επομένως, αξίζει να διερευνηθεί με βάση τα αποτελέσματά μας και εάν το εκχύλισμα βόστρυχου αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων μέσω μείωσης της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης και αντίστοιχης αύξησης του φαινυλοξικού οξέος.

Την έβδομη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,59 φορές παρουσίασε το γονίδιο *FOXA1*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων που ανήκει στην κατηγορία των ‘forkhead’ (GenBank). Παρόμοιοι μεταγραφικοί παράγοντες στα ποντίκια παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων του ήπατος και του παγκρέατος (GenBank). Δεν έχει όμως αναφερθεί εάν αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας συνδέεται με την καρκινογένεση σε ηπατικά κύτταρα.

Την όγδοη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,59 φορές παρουσίασε το γονίδιο *UBE2C*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των E2 ενζύμων που συνδέονται με την ουβικιτίνη. Η πρωτεΐνη αυτή χρειάζεται για την αποικοδόμηση των μιτωτικών κυκλινών, ενώ η αυτοαποικοδόμηση της αποτελεί σήμα για την ολοκλήρωση της μίτωσης και την έναρξη ενός νέου διπλασιασμού του DNA. Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς τύπους καθώς και σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα ασθενών με ηπατοκαρκίνωμα (Ieta και συν., 2007). Επίσης, η ίδια μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση αυτού του γονιδίου συνδεότανε με κακή πρόγνωση όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών (Ieta και συν., 2007). Επίσης, καταστολή της έκφρασης αυτού του γονιδίου ανέστειλε την αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων που δεν οφειλότανε σε κυτταρικό θάνατο αλλά σε σταμάτημα στη G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου (Ieta και συν., 2007). Έτσι, θεωρείται ότι σε ασθενείς με καρκίνο του ήπατος όπου υπερεκφράζεται αυτό το γονίδιο μπορεί να αποτελέσει στόχο αντικαρκινικών φαρμάκων (Ieta και συν., 2007).

Την ένατη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,58 φορές παρουσίασε το γονίδιο *CCNA2*. Η πρωτεΐνη, κυκλίνη A2, που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των κυκλινών (GenBank). Οι κυκλίνες δρουν ως ρυθμιστές των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDK). Η συγκεκριμένη κυκλίνη ενεργοποιεί τις CDC2 και CDK2 κινάσες και έτσι προωθεί τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1/S

και G2/M. Έχει αναφερθεί ότι αναστολή της αύξησης καρκινικών ηπατοκυττάρων επιτυγχάνεται μέσω μείωσης της έκφρασης της κυκλίνης A2 (Huang και συν., 2013).

Τη δέκατη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 2,57 φορές παρουσίασε το γονίδιο *C1orf131* του οποίου η πρωτεΐνη δεν έχει χαρακτηριστεί (GenBank).

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 2 φορές, στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επώαστηκαν για 24 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου υπερεκφράστηκαν 187 γονίδια και υποεκφράστηκαν 296 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση κατά 12,9 φορές την παρουσίασε το γονίδιο *LOC100132564* το οποίο όμως πλέον έχει αφαιρεθεί από τη βάση δεδομένων GenBank.

Το γονίδιο με τη δεύτερη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 6,8 φορές ήταν το *LOC100008588*. Το γονίδιο κωδικοποιεί το 18S RNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας. Το 18S rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας συντίθεται αρχικά σαν ένα πρόδρομο μόριο 45S rRNA από το οποίο προκύπτουν τα μόρια 18S της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, και τα μόρια 5,8S και 28S rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας. Ήταν χαρακτηριστικό πως και το γονίδιο *LOC100008589* για το 28S RNA παρουσίασε υπερέκφραση κατά 3 φορές. Επίσης, και το γονίδιο *RN5S9* για το 5S RNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας παρουσίασε υπερέκφραση κατά 2,4 φορές. Η αύξηση στην έκφραση των γονιδίων των ριβοσωμικών RNA δεν είναι αναμενόμενη σε κύτταρα τα οποία έχουν μπει σε διαδικασία απόπτωσης και άρα μειώνεται η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Άλλωστε, παρατηρήθηκε ελάττωση στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σύνθεση των κυτταροπλασματικών ριβοσωμάτων (π.χ. *RSL24D1*, *RPL21*, *RPL13A*) ή των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων (π.χ. *MRPS9* υποέκφραση κατά 2 φορές).

Το γονίδιο με την τρίτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 6,4 φορές ήταν το *LOC100133565* το οποίο έχει αντικατασταθεί στη βάση δεδομένων GenBank από το *LOC728688* που θεωρείται ψευδογονίδιο, αν και στη βάση δεδομένων Celera θεωρείται ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνη. Θεωρείται ψευδογονίδιο της παρόμοιας με την ουβικιτίνη πρωτεΐνης με τομείς PHD και RING Finger 1, που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του αποπτωτικού μονοπατιού που είναι εξαρτώμενο από την p53 πρωτεΐνη (GenBank).

Το γονίδιο με την τέταρτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 6,2 φορές ήταν το *'brain-enriched guanylate kinase-associated homolog'* που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία δεν είναι γνωστή.

Το γονίδιο με την πέμπτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 5,7 φορές ήταν το *ITGA2* που κωδικοποιεί την άλφα υπομονάδα μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που είναι υποδοχέας για το κολλαγόνο και παρόμοιες με αυτό πρωτεΐνες, και παίζει ρόλο στην προσκόλληση διαφόρων κυτταρικών τύπων με το εξωκυτταρικό δίκτυο. Αξίζει να τονιστεί ότι η αποδιοργάνωση του εξωκυτταρικού δικτύου παίζει καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση (Lu και συν., 2012).

Το γονίδιο με την έκτη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,6 φορές ήταν το *ANGPTL4* που κωδικοποιεί την παρόμοια με την αγγειοποιητίνη πρωτεΐνη 4. Πρόκειται για μια γλυκοσυλιωμένη εκκρινόμενη πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι έχει αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση *in vitro* και *in vivo* κυρίως μέσω καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού *'Extracellular signal-regulated kinases'* (ERK) (Okochi-Takada και συν., 2014).

Το γονίδιο με την έβδομη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,25 φορές ήταν το *F2RL1*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την παρόμοια με τον υποδοχέα της θρομβίνης 1 πρωτεΐνη 1 (F2RL1 ή PAR2). Η F2RL1 ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που συνδέονται με πρωτεΐνες που συνδέονται με το νουκλεοτίδιο γουανοσίνη. Επίσης, η F2RL1 είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (GenBank). Όσον αφορά το ρόλο αυτής της πρωτεΐνης στην καρκινογένεση έχει αναφερθεί ότι αυξημένη μεθυλίωση και άρα μειωμένη έκφραση του γονιδίου *F2RL1* συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα επιβίωσης ασθενών με οξεία μυελοειδή λευχαιμία (Marcucci και συν., 2013). Οπότε, δεν μπορεί να εξηγηθεί η αύξηση στην έκφραση αυτού του γονιδίου από το εκχύλισμα βόστρυχου.

Το γονίδιο με την όγδοη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 4,24 φορές ήταν το *LOC441763*. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για το ρόλο της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο.

Το γονίδιο με την ένατη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 3,94 φορές ήταν το *CPXMI*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των καρβοξυπεπτιδασών, αν και δεν έχει ανιχνεύσιμη τέτοια ενζυμική δράση (GenBank). Πιστεύεται ότι είναι μια εξωκυτταρική ή μεμβρανική πρωτεΐνη που συμμετέχει σε

κυτταρικές αλληλεπιδράσεις (GenBank). Γενικά, υπάρχουν λίγες πληροφορίες για το ρόλο αυτής της πρωτεΐνης και ιδιαίτερα όσον αφορά το ρόλο της στην καρκινογένεση.

Το γονίδιο με τη δέκατη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 3,85 φορές ήταν το *AKAP12*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συνδέονται με την Α-κινάση. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στην περιφέρεια του κυττάρου και συνδέεται με τις κινάσες Α και C και με φωσφατάσες, και δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Επίσης, αυτή η πρωτεΐνη σχετίζεται με την κυτταρική αύξηση (GenBank). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το γονίδιο *AKAP12* έχει μειωμένη έκφραση σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με υγιή κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του ήπατος, ενώ η μειωμένη έκφραση συνδεότανε και με κακή πρόγνωση για επιβίωση (Hayashi και συν., 2012). Επομένως, πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη *AKAP12* μπορεί να δρα ογκοκατασταλτικά στον καρκίνο του ήπατος.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2 που επώαστηκαν για 24 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου, τη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4,2 φορές είχε το γονίδιο *HOXD1* που είναι μέλος της οικογένειας των γονιδίων *Antrp* του ομοιοπλαισίου (homeobox). Το γονίδιο *HOXD1* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και εμπλέκεται στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των άκρων. Όσον αφορά τη σχέση ανάμεσα στο γονίδιο *HOXD1* και την καρκινογένεση, έχει βρεθεί ότι η αποσιώπηση αυτού του γονιδίου σχετίζεται με διάφορες μορφές καρκίνου (Freemantle και συν., 2002), και αυτό εξηγείται από το ότι η πρωτεΐνη *HOXD1* επάγει τη διαφοροποίηση. Οπότε, η υποέκφραση αυτού του γονιδίου από το εκχύλισμα δεν μπορεί να εξηγηθεί όσον αφορά την αντικαρκινική του δράση.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, τη δεύτερη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 4 φορές είχε το γονίδιο *HAMP* που κωδικοποιεί την εψιδίνη. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρόδρομη μορφή πρωτεΐνης που διασπάται μετα-μεταφραστικά σε τρία πεπτίδια που έχουν και αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, ο κυριότερος ρόλος της εψιδίνης είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του σιδήρου στον οργανισμό (GenBank). Συγκεκριμένα, η εψιδίνη, που παράγεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα, αναστέλλει την εντερική απορρόφηση του σιδήρου έτσι ώστε να προλαμβάνει την υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου και έτσι συμβάλλει στη διατήρηση φυσιολογικών συγκεντρώσεων του στον οργανισμό (Chen and Chloupková 2009). Συγκεκριμένα, η εψιδίνη εμποδίζει τη

μεταφορά του σιδήρου από τα εντερικά κύτταρα και από τα μακροφάγα προς το αίμα. Έχει βρεθεί μια στενή σχέση ανάμεσα στον καρκίνο του ήπατος και στην υπερβολική συγκέντρωση σιδήρου στα ηπατικά κύτταρα (Chen and Chlourkonά 2009). Επίσης, έχει βρεθεί ελαττωμένη έκφραση του *HAMP* στα ηπατικά κύτταρα ασθενών με καρκίνο του ήπατος (Chen and Chlourkonά 2009). Η πρωτεΐνη εσιδίνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της συγκέντρωσης σιδήρου και στα ηπατικά κύτταρα, με τα υπόλοιπα μόρια που συμμετέχουν σε αυτή τη ρύθμιση είτε να ελέγχουν την έκφραση του *HAMP* είτε να αποτελούν μοριακούς στόχους της εσιδίνης (Chen and Chlourkonά 2009). Η εσιδίνη στα ηπατικά κύτταρα αυξάνει τη συσσώρευση του σιδήρου. Η αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου στα κύτταρα όμως μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και άρα σε βλάβες στο DNA και σε καρκινογένεση. Από την άλλη όμως, η αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου στα ηπατικά κύτταρα οδηγεί σε απόπτωση (Zhao και συν., 1997). Έτσι λοιπόν, η πρόκληση απόπτωσης από το εκχύλισμα του βόστρυχου μπορεί να οφείλεται στο ότι αυξάνεται η συγκέντρωση σιδήρου στα ηπατικά κύτταρα μέσω μείωσης της εσιδίνης. Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων σιδήρου να προκαλέσουν απόπτωση λόγω προ-οξειδωτικής δράσης (Azam και συν., 2004; Stagos και συν., 2005).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την τρίτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,8 φορές είχε το γονίδιο *ID1*, το οποίο είχε σημαντική υπέκφραση όπως αναφέρθηκε παραπάνω και στα ηπατικά καρκινικά κύτταρα που επώαστηκαν για 4 ώρες με το εκχύλισμα από βόστρυχο αμπέλου.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την τέταρτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,5 φορές είχε το γονίδιο *KIAA0101*. Υπερέκφραση αυτού του γονιδίου έχει βρεθεί σε διάφορους καρκινικούς τύπους, ενώ μειωμένη έκφραση αυτού του γονιδίου αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων (Zhang και συν., 2012). Επίσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπερέκφραση αυτού του γονιδίου *in vivo* επάγει την ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών ξеноμοσχευμάτων (Liu και συν., 2012). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη του γονιδίου *KIAA0101* αναστέλλει την απόπτωση ηπατικών καρκινικών κυττάρων μέσω αναστολής της μεταγραφικής δράσης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 (Liu και συν., 2012). Επιπλέον, το αντικαρκινικό φάρμακο doxorubicin αύξησε την απόπτωση ηπατικών καρκινικών κυττάρων μέσω μείωσης της έκφρασης του *KIAA0101* (Liu και συν., 2012).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την πέμπτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,39 φορές είχε το γονίδιο *GPAM*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μιτοχονδριακό

ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί κορεσμένα λιπαρά οξέα για τη σύνθεση λιπιδίων. Όσον αφορά τη σχέση με τον καρκίνο του ήπατος, έχει βρεθεί ότι το *GPAM* ήταν μεταξύ των γονιδίων που είχε υπερεκφραστεί στο ήπαρ ατόμων που είχαν μολυνθεί με τον ιό της ηπατίτιδας HCV (Hevezi και συν., 2011). Η αυξημένη έκφραση οφείλονταν στην επαγωγή του μοριακού μονοπατιού που ελέγχεται από την ιντερφερόνη. Γενικότερα, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το ρόλο αυτού του γονιδίου στην καρκινογένεση.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την έκτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,35 φορές είχε το γονίδιο *CCDC34*. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την έβδομη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,34 φορές είχε το γονίδιο *TOP2A*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την DNA τοποϊσομεράση II, ένα ένζυμο που παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA και αποτελεί στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων (GenBank). Υπάρχουν αρκετές μελέτες όπου η αναστολή της δράσης αυτού του ενζύμου προκαλεί απόπτωση σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα, ωστόσο δεν αναφέρεται συχνά η αναστολή στην έκφραση του. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι υπερέκφρασή του σε ασθενείς με ηπατοκαρκίνωμα συνδέεται με εμφάνιση της ασθένειας σε μικρότερη ηλικία, με χειρότερη πρόγνωση όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών και με χημειοανθεκτικότητα (Wong και συν., 2009).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την όγδοη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,22 φορές είχε το γονίδιο *DKK1*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας 'dickkopf'. Πρόκειται για μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσω αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Αυξημένα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης στον ορό θεωρούνται βιοδείκτης για καρκίνο του ήπατος, ενώ συνδέονται και με κακή πρόγνωση μετά από εγχείρηση για ενδοηπατικό χολαγγειοκαρκίνωμα καθώς και με αυξημένη πιθανότητα για μετάσταση σε λεμφαδένες (Shen και συν., 2012; Shi και συν., 2013).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την ένατη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,21 φορές είχε το γονίδιο *ANKRD38*. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τη δράση της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο.

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, την δέκατη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 3,20 φορές είχε το γονίδιο *MIXL1*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο περιέχει περιοχή ομοιοπλαισίου (homeodomain). Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη (GenBank). Δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με το ρόλο που θα μπορούσε να έχει αυτή η πρωτεΐνη στον

καρκίνο του ήπατος, αλλά έχει αναφερθεί ότι αυξημένη έκφραση αυτού του γονιδίου παρεμποδίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του αίματος και οδηγεί σε οξεία μυελοειδή λευχαιμία (Glaser και συν., 2006).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη ήταν πολύ ενδιαφέροντα όσον αφορά την εύρεση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης αναστέλλει την αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 καθώς βρέθηκαν πολλά και σημαντικά γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται και συνδέονται με σημαντικές λειτουργίες των ηπατοκυττάρων αλλά και της καρκινογένεσης στο ήπαρ. Επίσης, ήταν πολύ ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων ανάμεσα στα πρώιμα και στα μεταγενέστερα στάδια της αναστολής της κυτταρικής αύξησης από το εκχύλισμα. Από τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν στις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *TAGLN*, *THBS1* και *KLF6*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στις 4 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *ID1*, *AURKA*, *TYMS*, *CEBPA*, *PAH*, *FOXA1*, *UBE2C* και *CCNA2*. Από τα γονίδια που υπερεκφράστηκαν στις 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *LOC100133565*, *ITGA2*, *ANGPTL4* και *AKAP12*. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν στις 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα τα σημαντικότερα ήταν τα *HAMP*, *ID1*, *GPAM*, *TOP2A* και *DKK1*. Πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί αναλυτικότερα ο ρόλος της αλλαγής της έκφρασης αυτών των γονιδίων στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση του εξεταζόμενου εκχυλίσματος βόστρυχου έναντι του καρκίνου του ήπατος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* **1997**; 29: 95–120.

Amico V, Chillemi R, Mangiafico S, Spatafora C, Tringali C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresour. Technol.* **2008**;99:5960–5966.

Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, George-John EN, Haroutounian SA. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2009**;57:457–463.

Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D. *Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts.* *Food Chem Toxicol.* **2013** Nov;61:60-8.

Arnous A, Makris DP, Kefalas P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Compos. Anal.* **2002**;15:655–665.

Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**; 24:1355–1363.

Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissedre P, Rouanet JM. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J. Agric. Food Chem.* **2004**;52:5297–5302.

Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, Besançon P, Caporiccio B, Cristol JP, Rouanet JM. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and

resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J. Agric. Food Chem.* **2005**;53:2015–2021.

Austin KT, Butzke CE. Spectrophotometric assay for arginine in grape juice and must. *Am J Enol Vitic* . **2000**;51(3):227-232.

Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro.* **2004** 18(5):555-61

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray CA, Kuszynski SS, Joshi HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* **2000**;148:187–197.

Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res. Bull.* **2006**;68:469–473.

Balu M, Sangeetha P, Haripriya D, Panneerselvam C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci. Lett.* **2005**;383:295–300.

Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Int. J. Food Sci.* **2006**;41:799–804.

Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**;71:103–108.

Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.* **1998**; 24:133–138.

Bidlack WR, Omay ST., Meskin MS, Topham DKW, Phytochemicals as bioactive agents, *CRC Press*. **2000**.

Bishayee, A., Dhir, N., **2009**. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 179, 131–144.

Bishayee, A., Barnes, K.F., Bhatia, D., Darvesh, A.S., Carroll, R.T., **2010a**. Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev. Res.* 3, 753–763.

Bishayee, A., Waghray, A., Barnes, K.F., Mbimba, T., Bhatia, D., Chatterjee, M., Darvesh, A.S., **2010b**. Suppression of the inflammatory cascade is implicated in resveratrol chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis. *Pharm. Res.* 27, 1080–1091

Bosch FX, Ribes J, Borràs J., Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis.* **1999**;19(3):271-85.

Bralley EE, Hargrove JL, Greenspan P, Hartle DK. Topical anti-inflammatory activities of vitis rotundifolia (*Muscadine Grape*) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. *J. Med. Food.* **2007**;10:636–642.

Brown JC, Huang G, Haley-Zitlin V, Jiang XP. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**;75:848–852.

Brown, V.A., Patel, K.R., Viskaduraki, M., Crowell, J.A., Perloff, M., Booth, T.D., Vasilinin, G., Sen, A., Schinas, A.M., Piccirilli, G., Brown, K., Steward, W.P., Gescher, A.J., Brenner, D.E., **2010**. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res.* 70, 9003–9011.

Bruno G, Sparapano L. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2007**;71:210–229.

C

Cantos E, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2002**;50:5691–5696.

Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric.* **2000** 80:1044–1062.

Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gomez-Coronado D, Ortuno J, Lasuncion MA. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**; 84:252–262.

Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, Hacıoglu SK, Saraymen R, Ozturk A, Sari I, Sagdic O. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *Am. J. Chin. Med.* **2008**;36:861–872.[

Chacona MR, Ceperuelo-Mallafrea V, Maymo-Masipa E, Mateo-Sanzb JM, Arolac L, Guitierrez C, Fernandez-Reald JM, Ardevolc A, Simona I, Vendrella J. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine.* **2009**;47:137–142.

Chavez JH, Leal PC, Yunes RA, Nunes RJ, Barardi CR, Pinto AR, Simoes CM, Zanetti CR. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet. Microbiol.* **2006**;116:53–59.

Chen J, Chloupková M. *Abnormal iron uptake and liver cancer.* *Cancer Biol Ther.* **2009** 8(18):1699-708

Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* **1999** 79:362–372

Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric.* **2000** 80:1118–1125.

Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Bioch.* **1996** 7:66-76.

Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**; 68 (suppl.) 1486S-1491S.

Crane R, Gadea B, Littlepage L, Wu H, Ruderman JV. Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell.* 2004 96(3):215-29.

Dani C, Oliboni LS, Vanderlinde R, Pra D, Dias JF, Yoneama ML, Bonatto D, Salvador M, Henriques JAP. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *J. Med. Food.* **2009**;12:188–192.

de Bruyne T, Pieters L, Witvrouw M, de Clercq E, Berghe DV, Vlietinck AJ. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. *J. Nat. Prod.* **1999**;62:954–958.

De Lidinghen, V., Monvoisin, A., Neaud, V., Krisa, S., Payrastre, B., Bedin, C., Desmoulière, A., Bioulac-Sage, P., Rosenbaum, J., **2001**. Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 19, 83–88.

Dell Agli M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. *In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**;53:1960–1965.

Delmas, D., Jannin, B., Cherkaoui Malki, M., Latruffe, N., **2000**. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. *Oncol. Rep.* 7, 847–852.

Diab T, Hanoun N, Bureau C, Christol C, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. *The Role of the 3' Untranslated Region in the Post-Transcriptional Regulation of KLF6 Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma*. *Cancers (Basel)*. **2013** 6(1):28-41.

Dopico-Garcia MS, Figue A, Guerra L, Afonso JM, Pereira O, Valentao P, Andrade PB, Seabra RM. Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: anthocyanins or non-coloured compounds? *Talanta*. **2008**;75:1190–1202.

Ensminger ME, Ensminger AH. *Foods & Nutrition Encyclopedia*, Vol 1 . 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; **1994**:1093-1099.

Faria A, Calhau C, De Freitas V, Mateus N. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J. Agric. Food Chem.* **2006**;54:2392–2397.

Falchi M, Bertelli A, Scalzo RL, Morassut M, Morelli R, Das S, Cui JH, Das DK. Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2006**;54: 6613–6622.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M. and Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. **2007**, 18: 581–592

Finding the white wine difference. (Press release). *Common wealth Scientific and Industrial Research Organisation*. 2 March 2007. Retrieved 17 April 2011.

Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH, Spinella MJ. *Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma*. *Oncogene*. 2002 21(18):2880-9.

Fuleki T, Pelavo E, Palabay RB. Carboxylic acid composition of authentic varietal and commercial grape juices. *J AOAC Int* . **1993**;76(3):591-600.

Fynan TM, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog*. **1993**, 4(5): 493-540.

Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara ML, Periago MJ. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr. Res*. **2006**; 26:330–339.

Glaser S, Metcalf D, Wu L, Hart AH, DiRago L, Mifsud S, D'Amico A, Dagger S, Campo C, Chan AC, Izon DJ, Robb L. *Enforced expression of the homeobox gene Mixl1 impairs hematopoietic differentiation and results in acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2006** 103(44):16460-5.

Granado-Serrano, A.B., Angeles Martin, M., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., **2008**. Timecourse regulation of quercetin on cell survival/proliferation pathways in human hepatoma cells. *Mol. Nutr. Food Res*. 52, 457–464.

Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., **2010**. Quercetin modulates NF-kappa B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutr. Cancer* 62, 390–401

God JM, Tate P, Larcom LL. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *J. Med. Food*. **2007**;10:54–59.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. **1996**, 86(3): 353-64.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. **2000**, 100(1): 57-70.

Hayashi M, Nomoto S, Kanda M, Okamura Y, Nishikawa Y, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Takeda S, Koderu Y. *Identification of the A kinase anchor protein 12 (AKAP12) gene as a candidate tumor suppressor of hepatocellular carcinoma*. J Surg Oncol. **2012** 105(4):381-6.

Henke E, Perk J, Vider J, de Candia P, Chin Y, Solit DB, Ponomarev V, Cartegni L, Manova K, Rosen N, Benezra R. Peptide-conjugated antisense oligonucleotides for targeted inhibition of a transcriptional regulator in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008 26(1):91-100.

Hernandez-Jimenez A, Gomez-Plaza E, Martinez-Cutillas A, Kennedy JA. Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**;57:10798–10803.

Hettmann K. Flavonols and flavons in food plants: a review. *J. Food Technol.* **1976**; 11:433-448.

Hevezi PA, Tom E, Wilson K, Lambert P, Gutierrez-Reyes G, Kershenobich D, Zlotnik A. *Gene expression patterns in livers of Hispanic patients infected with hepatitis C virus. Autoimmunity.* **2011** 44(7):532-42.

Huang HL, Hsu HP, Shieh SC, Chang YS, Chen WC, Cho CY, Teng CF, Su IJ, Hung WC, Lai MD. *Attenuation of argininosuccinate lyase inhibits cancer growth via cyclin A2 and nitric oxide.* *Mol Cancer Ther.* **2013** Nov;12(11):2505-16

Hudson TS, Hartle DK, Hursting SD, Nunez NP, Wang TTY, Young HA, Arany P, Green JE. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Res.* **2007**;67:8396–8405.

Ieta K, Ojima E, Tanaka F, Nakamura Y, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, Kuwano H, Mori M. *Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression.* *Int J Cancer.* **2007** Jul 1;121(1):33-8.

Jung HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch. Pharm. Res.* **2005**;2:557–560.

Jung K, Wallig M, Singletary K. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and *in vivo* DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett.* **2006**;233:279–288.

K

Khanduja, K.L., Bhardwaj, A., Kaushik, G., **2004**. Resveratrol inhibits Nitrosodiethylamine- induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50, 61–65.

King G. C. Pnenolic compounds of commercial wheat germ. *J. Food Sci.* **1962**; 446-454

Korkina, L.G., De Luca, C., Kostyuk, V.A., Pastore, S., **2009**. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr. Med. Chem.* 16, 3943–3965.

Koswig S, Hofsommer HJ. HPLC method for determination of anthocyanins in colored juices and other pigmented foods. *Flüssiges Obst* . **1995**;62(4):125,128-30.

Kozuki, Y., Miura, Y., Yagasaki, K., **2001**. Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative action. *Cancer Lett.* 167, 151– 156.

Kuo, P.L., Chiang, L.C., Lin, C.C., **2002**. Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci.* 72, 23–34.

L

Lakenbrick C, Lapczynski S, Mailwaid B,Engelhardt U H. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.*2000; 48:2848-2852.

Laklai, H., Laval, S., Dumartin, L., Rochaix, P., Hagedorn, M., Bikfalvi, A., Le Guellec, S., Delisle, M.B., Schally, A.V., Susini, C., Pyronnet, S., Bousquet, C., 2009. Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17769–17774

Lazze MC, Pizzala R, Pecharroman FJG, Garnica PG, Rodriguez JMA, Fabris N, Bianchi L. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive

antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *J. Med. Food.* **2009**;12:561–568.

Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *J Cereal Sci.* **1997** 25:103–110.

Lea AGH, Bridle P, Timberlake CF, Singleton VL. The procyanidins of white grapes and wines. *Am J Enol Vitic.* **1979** 30:289-300.

Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol. Sin.* **2001**;22:1117–1120.

Linget C, Netter C, Heems D, Verette E. On-line dialysis with HPLC for the automated preparation and analysis of amino acids, sugars, and organic acids in grape juice and wines. *Analusis* . **1998**;26(1):35-39.

Liu L, Chen X, Xie S, Zhang C, Qiu Z, Zhu F. *Variant 1 of KIAA0101, overexpressed in hepatocellular carcinoma, prevents doxorubicin-induced apoptosis by inhibiting p53 activation.* *Hepatology.* **2012** 56(5):1760-9

Loa, J., Chow, P., Zhang, K., **2009**. Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 1007–1016.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012 Feb 20;196(4):395-406

Luther M, Parry J, Moore J, Meng JH, Zhang YF, Cheng ZH, Yu L. Inhibitory effect of chardonnay and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. *Food Chem.* **2007**;104:1065–1073.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. 1999 401(6754):670-677

Macheix J.J, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton, FL.CRC Press, **1990**

Majo DD, Guardia ML, Giammanco S, Neve LL, Giammanco M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem*. **2008**; 111:45–49.

Majo DD, Giammanco M, Guardia ML, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships. *Food Res. Int*. **2005**; 38:1161–1166.

Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK, Kefalas P. Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol*. **2008**;226:1075–1079.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. **2004** 79:727-747

Marcucci G, Yan P, Maharry K, Frankhouser D, Nicolet D, Metzeler KH, Kohlschmidt J, Mrózek K, Wu YZ, Bucci D, Curfman JP, Whitman SP, Eisfeld AK, Mendler JH, Schwind S, Becker H, Bär C, Carroll AJ, Baer MR, Wetzler M, Carter TH, Powell BL, Kolitz JE, Byrd JC, Plass C, Garzon R, Caligiuri MA, Stone RM, Volinia S, Bundschuh R, Bloomfield CD. *Epigenetics meets genetics in acute myeloid leukemia: clinical impact of a novel seven-gene score*. *J Clin Oncol*. **2014** 32(6):548-56.

Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* . **1995**;35(4):341-371

Mellick AS, Plummer PN, Nolan DJ, Gao D, Bambino K, Hahn M, Catena R, Turner V, McDonnell K, Benezra R, Brink R, Swarbrick A, Mittal V. Using the transcription factor

inhibitor of DNA binding 1 to selectively target endothelial progenitor cells offers novel strategies to inhibit tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* 2010 70(18):7273-82.

Mazza GJ. Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist Super Sanita.* 2007;43:369–374.

Mersch-Sundermann, V.; Knasmüller, S.; Wu, X. J.; Darroudi, F.; Kassie, F. (2004). "Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents". *Toxicology* 198(1–3): 329–340

Meyer AS, Yi OS, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in *grapes* (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* 1997;45:1638–1643.

Michels, G., Wd̄tjen, W., Weber, N., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkøtter, A., Proksch, P., Kahl, R., 2006. Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells. *Toxicology* 225, 173–182.

Middleton E Jr, Kandaswami C, and Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673–751

Missailidis S. The Cancer Clock. *Wiley.* 2007

Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, Honda M, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group. *Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma.* *Br J Cancer.* 2013 109(8):2072-8.

Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2010 Jul;42 Suppl 3:S206-14

Novaka I, Janeiroa P, Serugab M, Oliveira-Brett AM. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta.* **2008**;630:107–115.

Olas B, Wachowicz B, Tomczak A, Erler J, Stochmal A, Oleszek W. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* *in vitro*. *Platelets.* **2008**;19:70–77.

Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S, Yamamura Y, Wakabayashi M, Nobeyama Y, Ushijima T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene.* 2013 (in press).

Panico AM, Cardile V, Avondo S, Garufi F, Gentile B, Puglia C, Bonina F, Santagati NA, Ronsisvalle G. The *in vitro* effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes. *Phytomedicine.* **2006**;13:522–526.

Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **2006** Aug 28;240(2):157-69. Epub 2005 Oct 17. Review

Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Taphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* **2005**;43:41–46.

Parekh, P., Motiwale, L., Naik, N., Rao, K.V., **2011**. Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 167–173.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* **2001**; 37:S4-S66

Pastrana-Bonilla E, Akoh CC, Sellappan S, Krewer G. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2003**; 51:5497–4503.

Patel, K.R., Brown, V.A., Jones, D.J., Britton, R.G., Hemingway, D., et al., **2010**. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 70, 7392–7399.

Pela M, Saxena P, Luciani R, Santucci M, Ferrari S, Marerti G, Marraccini C, Martello A, Pirondi S, Genovese F, Salvadori S, D'Arca D, Ponterini G, Costi MP, Guerrini R. Optimization of peptides that target human thymidylate synthase to inhibit ovarian cancer cell growth. *J Med Chem.* 2014 (in press).

Price S F, Breen P J, Valladao M, Watcon B T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol Vitic.* **1995**; 46:187-194.

Qin Q, Qian J, Ge L, Shen L, Jia J, Jin J, Ge J. Effect and mechanism of thrombospondin-1 on the angiogenesis potential in human endothelial progenitor cells: an in vitro study. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e88213

Ramos, S., **2008**. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507–526.

Rivero-Perez MD, Muniz P, Gonzalez-Sanjose ML. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food Chem. Toxicol.* **2008**;46:2815–2822.

Ramos S, Alia M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2) *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:1271–1280.

Rhodes PL, Mitchell JW, Wilson MW, Melton LD. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**;107:281–286.

Robbins, R.J., **2003**. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887.

Rodriguez-Vaquero MJ, Alberto MR, Manca-de-Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. **2007**;18:93–101.

Rodriguez-Vaquero MJ, Alberto MR, Manca-de-Nadra MC. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **2007**; 18:587–593.

Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Russo, G.L., **2012**. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.* 83 (1), 6–15.

Sahpazidou D, Geromichalos GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN, Hayes AW, Kouretas D. *Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells*. *Toxicol Lett*. **2014** (in press).

Sajnani MR, Patel AK, Bhatt VD, Tripathi AK, Ahir VB, Shankar V, Shah S, Shah TM, Koringa PG, Jakhesara SJ, Joshi CG. *Identification of novel transcripts deregulated in buccal cancer by RNA-seq*. *Gene*. **2012** 507(2):152-8.

Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J. Ethnopharmacol.* **2002**; 81:327–336.

Sanchez-Perez, Y., Carrasco-Legleu, C., Garcva-Cuellar, C., Perez-Carreón, J., Hernández-Garcva, S., Salcido-Neyoy, M., Alemón-Lazarini, L., Villa-Trevipo, S., **2005**. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 217, 25–32.

Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**; 80:1094-1117.

Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* **1996**;44:37–41.

Sawatsri S, Samid D, Malkapuram S, Sidell N (2001) *Inhibition of estrogen-dependent breast cell responses with phenylacetate.* *Int J Cancer.* **2001** 93:687–692.

Serra AT, Matias AA, Nunes AVM, Leitao MC, Brito D, Bronze R, Silva S, Pires A, Crespo MT, Romao MVS, Duarte CM. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Inno. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**;9:311–319.

Seufi, A.M., Ibrahim, S.S., Elmaghraby, T.K., Hafez, E.E., **2009**. Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28, 80.

Shahidi F, Naczek M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. *Technomic Publishing Co Inc*: Lancaster, PA, **1995**

Shanmuganayagam D, Warner TF, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis.* **2007**;190:135–142.

Sharma, A., Upadhyay, A.K., Bhat, M.K., **2009**. Inhibition of Hsp27 and Hsp40 potentiates 5-fluorouracil and carboplatin mediated cell killing in hepatoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 8, 2106–2113.

Shen Q, Fan J, Yang XR, Tan Y, Zhao W, Xu Y, Wang N, Niu Y, Wu Z, Zhou J, Qiu SJ, Shi YH, Yu B, Tang N, Chu W, Wang M, Wu J, Zhang Z, Yang S, Gu J, Wang H, Qin W. *Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study.* *Lancet Oncol.* **2012** 13(8):817–26.

Shi RY, Yang XR, Shen QJ, Yang LX, Xu Y, Qiu SJ, Sun YF, Zhang X, Wang Z, Zhu K, Qin WX, Tang ZY, Fan J, Zhou J. *High expression of Dickkopf-related protein 1 is*

related to lymphatic metastasis and indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgery. *Cancer*. **2013** 119(5):993-1003.

Shrikhande AJ. Wine by-products with health benefits. *Food Res. Internat.* **2000**;33:469–474.

Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*. **2006**;22:295–302.

Sidell N, Wada R, Han G, Chang B, Shack S, et al. (1995) *Phenylacetate synergizes with retinoic acid in inducing the differentiation of human neuroblastoma cells*. *Int J Cancer* 600: 507–514.

Silva RC, Rigaud J, Cheynier V, Chemina A. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*. **1991**;30:1259–1264.

Singletary KW, Stansbury MJ, Giusti M, Breemen RBV, Wallig M, Rimando A. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2003**;51:7280–7286.

Sivaroban T, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res. Int.* **2008**;41:781–785.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal.* **1997** 11:287-313

Soobrattee MA, Neergheena VS, Luximon-Rammaa A, Aruomab OI, Bahoruna T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**; 579:200–213.

Spacil Z, Novakova L, Solich P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*. **2008**;76:189–199.

Sporn, M.B. and Liby, K.T. *Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. Nat Clin Pract Oncol* 2:518-525, **2005**.

Spranger I, Sun B, Mateus AM, de Freitas V, Ricardo-da-Silva JM. *Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. Food Chem.* **2008**;108:519–532.

Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D. *Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. Int J Mol Med.* **2005** 15(6):1013-22.

Stefanska B, Suderman M, Machnes Z, Bhattacharyya B, Hallett M, Szyf M. *Transcription onset of genes critical in liver carcinogenesis is epigenetically regulated by methylated DNA-binding protein MBD2. Carcinogenesis.* **2013** 34(12):2738-49.

Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C., **2006**. *Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. Cell Prolif.* 39, 479–493.

Sun, Z.J., Pan, C.E., Liu, H.S., Wang, G.J., **2002**. *Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. World J. Gastroenterol.* 8, 79–81.

Tagurt T, Tanaka T, Kouno I. *Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol. Pharm. Bull.* **2004**;27:1965–1969.

Tanigawa, S., Fujii, M., Hou, D.X., 2008. *Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 797–804.

Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Arola L. *Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. J. Nutr. Biochem.* **2009**;20:210–218.

Tomas-Barberan FA, Clifford MN. *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden*. *J Sci Food Agric*. **2000** 80:1073–1080.

Tsanga C, Higgins S, Duthiea GG, Duthiea SJ, Howiea M, Mullena W, Leana MEJ, Crozier A. *The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers*. *Br. J. Nutr.* **2005**; 93:233–240.

Urpi-Sarda M, Monagas M, Khan N, Lamuela-Raventos RM, Santos-Buelga C, Sacanella E, Castell M, Permanyer J, Andres-Lacueva C. *Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**;394:1545–1556.

van IJzendoorn S. C., Zegers M. M., Kok J. W., Hoekstra D. *Segregation of glucosylceramide and sphingomyelin occurs in the apical to basolateral transcytotic route in HepG2 cells*. *J. Cell Biol.* **1997**;137:347–357.

Vasquez-Garzon, V.R., Arellanes-Robledo, J., Garcia-Roman, R., Aparicio-Rautista, D.I., Villa-Trevipo, S., **2009**. *Inhibition of reactive oxygen species and preneoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism*. *Free Radic. Res.* 43, 128–137.

Vaughan, J.G. and C.A. Geissler. *The New Oxford Book of Food Plants (revised and updated edition)*. Oxford University Press, New York. **1997**

Wada M, Kido H, Ohyama K, Ichibangas T, Kishikaw N, Ohba Y, Nakashima MN, Kurod N, Nakashima K. *Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: evaluation of grape seed, monascus, ardenia and red radish extracts as multi-functional food additives*. *Food Chem.* **2007**; 101:980–986.

Walker, A. R. et al. (March **2007**). *"White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes"*. *The Plant Journal* 49 (5): 772–785.

Wong N, Yeo W, Wong WL, Wong NL, Chan KY, Mo FK, Koh J, Chan SL, Chan AT, Lai PB, Ching AK, Tong JH, Ng HK, Johnson PJ, To KF. *TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance.* Int J Cancer. **2009** 124(3):644-52.

Wolter, F., Ulrich, S., Stein, J., **2004.** *Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: key role of polyamines?* J. Nutr. 134, 3219–3222.

Wu, B.W., Li, D.F., Ke, Z.F., Ma, D., Li, Y.J., Gang, D., Zheng, Z.G., Zhang, K.J., Zhang, Y.H., **2010.** *Expression characteristics of heparanase in colon carcinoma and its close relationship with cyclooxygenase-2 and angiogenesis.* Hepatogastroenterology 57, 1510–1514.

Jayaprakasha GK, Tamil S, Sakartah KK. *Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts.* Food Res. Int. **2003**;36:117–122.

Yigit D, Yigit N, Mavi A, Yildirim A, Guleryuz M. *Antioxidant and antimicrobial activities of methanol and water extracts of fruits, leaves and seeds of Vitis vinifera L. cv. Karaerik.* Asian J. Chem. **2009**;21:183–194.

Yoo BK, Emdad L, Gredler R, Fuller C, Dumur CI, Jones KH, Jackson-Cook C, Su ZZ, Chen D, Saxena UH, Hansen U, Fisher PB, Sarkar D. *Transcription factor Late SV40 Factor (LSF) functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A. **2010** 107(18):8357-62.

Yoon JH, Kim K, Lee DS. *Chemometric aspects of sugar profiles in fruit juices using HPLC and GC.* Bull Korean Chem Soc . **1997**;18(7):695-702.

Zhang S, Jiang T, Feng L, Sun J, Lu H, Wang Q, Pan M, Huang D, Wang X, Wang L, Jin H. *Yin Yang-1 suppresses differentiation of hepatocellular carcinoma cells through the downregulation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha.* J Mol Med (Berl). **2012** 90(9):1069-77.

Zhang CF, Xia YH, Zheng QF, Li ZJ, Guo XH, Zhou HC, Zhang LL, Dong LP, Han Y. [Effects of KIAA0101 expression on proliferation and invasion of gastric carcinoma MKN-45 cells]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. **2012** 41(8):553-7.

Zhao M, Laissue JA, Zimmermann A. Hepatocyte apoptosis in hepatic iron overload diseases. Histol Histopathol. **1997** 12(2):367-74

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

http://en.wikipedia.org/wiki/Hep_G2

http://eol.org/data_objects/

www.cancer.net/all-about-cancer/risk-factors-and-prevention/chemoprevention

www.karkinos24.gr/index.php/giatonkarkino

www-dep.iarc.fr/

www.bestrong.org.gr/el/cancer/typesofcancer/livercancer/

www.medlook.gr-καρκίνος του ήπατος

www.oncolink.org/resources/article.cfm?c=&id=1049

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κερμελιώτου 2011. Μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος από βόστρυχο σταφυλιών στην αύξηση καρκινικών κυττάρων και στην αγγειογένεση

Μαρμάρας Β και Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μ. Βιολογία κυττάρου: Μοριακή προσέγγιση. *Typorama*, 2005