



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΚΑΡΑΝΑΤΣΙΟΥ ΠΑΓΩΝΑ-ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2017

Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης τριτερπενίων σε ανθρώπινο ηπατικό καρκίνωμα

Καρανάτσιου Παγώνα-Μαρία

Λιαδάκη Καλλιόπη

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

Effect of triterpenoids derivatives compounds in the development of liver cancer cells

Karanatsiou Pagona-Maria

Liadaki Kalliopi

Laboratory of Plant and Environmental Biotechnology

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματεύεται τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης τριτερπενοειδών ενώσεων σε ανθρώπινο ηπατικό καρκίνωμα.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν τα μέγιστα για την περάτωση της συγκεκριμένης εργασίας. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη, επίκουρο καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αρχικά για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά κυρίως για την τεράστια συμβολή της στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη φιλοξενία και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Καρανάτσιου Παγώνα – Μαρία

Λάρισα 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1. Καρκίνος.....	10
1.1.1. Γενικά.....	10
1.1.2. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης.....	11
1.1.3. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων.....	13
1.1.4. Ηπατοκαρκίνωμα.....	17
1.1.5. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα, HepG2.....	20
B. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ.....	21
2.1. Γενικά.....	21
2.2. Βιοσύνθεση τριτερπενίων	23
2.3. Βιολογικές δράσεις τριτερπενίων στα φυτά και στον άνθρωπο.....	25
2.4. Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος	26
2.5. Βιολογικές δράσεις ολεανολικού οξέος.....	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	30
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
3.1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά.....	31
3.2. Φυτικές ενώσεις.....	32
3.3. Μέθοδοι.....	33
3.3.1. Συντήρηση κυττάρων HepG2 σε καλλιέργεια.....	33
3.3.2. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας	34
3.3.2.1. Πάγωμα κυττάρων.....	34
3.3.2.2. Ξεπάγωμα κυττάρων.....	35
3.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου	36
3.5. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης με τη μέθοδο ΧΤΤ...	38

α. Αρχή της μεθόδου.....	38
β. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων που βασίζεται στη μέθοδο ΧΤΤ.....	39
3.6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	41
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	55
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	
Εικόνα 1: Παράγοντες που προκαλούν καρκίνο και τα στάδια μετασχηματισμού των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά	13
Εικόνα 2: Επίκτητες λειτουργικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων	18
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των καταρρακτών μεταγωγής σήματος, που σχετίζονται με τη βιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.....	19
Εικόνα 4: Μηχανισμοί δράσης του φαρμάκου Sorafenib.....	20
Εικόνα 5: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ενός 15χρονου αγοριού Λατινικής καταγωγής.....	22
Εικόνα 6: Απλοποιημένο σχήμα των κυριότερων οδών βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η αλληλοσυσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό.....	22
Εικόνα 7: Χημική δομή ισοπεντανίου.....	23
Εικόνα 8: Χημική δομή ισοπρενίου.....	24
Εικόνα 9: Περίγραμμα της βιοσύνθεσης των τερπενίων.....	26
Εικόνα 10: Δομή του βετουλινικού οξέος	27
Εικόνα 11: Επαγωγή της απόπτωσης μέσω του βετουλινικού οξέος.....	28
Εικόνα 12: Δομή του ολεανολικού οξέος.....	37
Εικόνα 13: Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου που βοηθά στη μέτρηση των κυττάρων.....	37
Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση του υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων στο κάθε γωνιακό τεταρτημόριο του πλακιδίου Neubauer.....	38
Εικόνα 15: Μεταβολισμός του ΧΤΤ και παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος φορμαζάνη.....	39
Εικόνα 16: Ο χρωματομετρικός μεταβολισμός του ΧΤΤ από κυτταρικά ένζυμα..	43
Εικόνα 17: : Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #2, #3, #9, #11 και #13 του βετουλινικού οξέος σε σχέση με το αρχικό μόριο.	44
Εικόνα 18: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #15, #17, #19, #21, #23 και #32 του βετουλινικού οξέος σε σχέση με το αρχικό μόριο.	45
Εικόνα 19: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #1 και #4 του βετουλινικού οξέος σε σχέση με το αρχικό μόριο.....	46
Εικόνα 20: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #5, #6, #7, #10 και #12 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.....	47
Εικόνα 21: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #14, #16, #18, #22 και #33 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.....	48
Εικόνα 22: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #34, #36, #40 και #45 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.....	49

Εικόνα 23: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #46, #48 και #51 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο..... 50

Εικόνα 24: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #20 και #50 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1-3: : Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα βετουλινικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μΜ..... 42, 43, 45

Διάγραμμα 4-8: : Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μΜ..... 46-50

Διάγραμμα 9: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 συναρτήσει των πιο δραστικών παραγώγων βετουλινικού και ολεανικού οξέος σε συγκέντρωση 10 μΜ..... 51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπενοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών σε όλο το φυτικό βασίλειο. Έρευνες έχουν αναδείξει τα τριτερπενοειδή ως μία από τις πιο σημαντικές κατηγορίες εξαιτίας των αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν την αντικαρκινική δραστηριότητα διαφόρων τριτερπενοειδών σε ποικίλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου ηπατικού καρκίνου, μια συχνή κακοήθεια ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντικαρκινική δράση ημισυνθετικών παραγώγων που προέκυψαν από τις κύριες καθарές ενώσεις του βετουλινικού και του ολεανικού οξέος. Συνολικά εξετάστηκαν 32 παράγωγα. Κάνοντας χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου ΧΤΤ πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της επιβίωσης κυττάρων HepG2 μετά από επώαση με τις υπό εξέταση ενώσεις για 24 ώρες. Η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των ημισυνθετικών ενώσεων, εκτός από τέσσερις περιπτώσεις. Αυτές αφορούν δύο παράγωγα του βετουλινικού και δύο παράγωγα του ολεανολικού οξέος, σε τελική συγκέντρωση 25 μM . Επιπλέον, ελέγχθηκε και η ενδεχόμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε χαμηλότερη συγκέντρωση των πιο δραστικών παραγώγων, δηλαδή σε συγκέντρωση της τάξης των 10 μM , αλλά και σε συνδυασμό των συγκεκριμένων ενώσεων. Τα συγκεκριμένα παράγωγα υπέδειξαν μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 ενώ ο συνδυασμός ενός παραγώγου του βετουλινικού οξέος και ενός ολεανικού οξέος οδήγησε σε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Εντούτοις, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, κρίνεται απαραίτητο η μελέτη να επεκταθεί για τη διασάφηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση αυτών των ενώσεων στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

ABSTRACT

Triterpenoids are one of the major categories of secondary metabolites throughout the plant kingdom. Studies have highlighted triterpenoids as one of the most important categories because of their antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. Moreover, studies demonstrate the anticancer activity of various triterpenes against a variety of cancer cell lines, including human hepatocellular carcinoma, a common malignancy, especially in the developing countries. The purpose of this study was to investigate the antitumor activity of semisynthetic derivatives, which were obtained from the main pure compounds of betulinic acid and oleanolic acid. A total amount of 32 derivatives were tested. The quantification of the HepG2 cells that survived was evaluated upon treatment with the various triterpenes for 24 hours, using the XTT colorimetric method. HepG2 growth was not affected upon treatment with the various semisynthetic derivatives, with the exception of four compounds. These were two derivatives of betulinic acid and two derivatives of oleanolic acid, at the final concentration of 25 μM . . In addition, this study tested the possible inhibition of cell growth at a lower concentration of the most active derivatives, which was 10 μM , and also with a combination of these compounds. These derivatives indicated a minimal inhibition of growth of HepG2 cells, however the combination of one derivative of betulinic acid with one derivative of oleanolic acid resulted in a statistically significant result. Nevertheless, in order to be able to draw a firm conclusion, this study must be extended to clarify the molecular mechanisms involved in the action of these compounds.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Καρκίνος

1.1.1. Γενικά

Ο καρκίνος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου στις οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες και η δεύτερη αιτία στις αναπτυσσόμενες χώρες σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*World Health Organization, 2008*). Είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες και οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως, προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Ο όρος “καρκίνος” είναι μία παθολογική κατάσταση μη ελεγχόμενης ή ανεξέλεγκτης αύξησης, πολλαπλασιασμού και λειτουργίας κυττάρων. Υπάρχουν περισσότερα από 200 διαφορετικά είδη καρκίνου, με τους πιο συχνούς στην Ευρώπη να αποτελούν τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη, με διαφορές όσον αφορά τις πιθανότητες εμφάνισης και της θνησιμότητας (*Ferlay J. et al., 2012*).

Η πλειονότητα των ανθρώπινων καρκίνων δε μπορεί να ερμηνευθεί βάσει μενδελικών (μονογονιδιακών) προτύπων κληρονομησης. Ο καρκίνος, λοιπόν, σε κυτταρικό επίπεδο είναι κατά βάση μια γενετική ασθένεια. Το σώμα μας αποτελείται από περισσότερα από ένα εκατομμύριο κύτταρα και η έναρξή του επιτυγχάνεται είτε σε ένα μόνο κύτταρο είτε σε μία μικρή ομάδα κυττάρων. Διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι είναι υπεύθυνοι για διαφορετικές λειτουργίες, αλλά όλοι είναι μεταξύ τους παρόμοιοι και ελέγχονται από ένα ειδικό κέντρο, τον πυρήνα. Μέσα στον πυρήνα λαμβάνουν θέση τα χρωμοσώματα, έχοντας ως κύριο γενετικό υλικό DNA (δεοξυριβονουκλεοτίδια). Το DNA αποτελείται από πολλά γονίδια, καθένα από τα οποία κωδικοποιεί είτε μία πρωτεΐνη είτε ένα διαφορετικό είδος μορίου, το ονομαζόμενο RNA και καθοδηγούν τη συμπεριφορά του κυττάρου. Συνήθως, έχουμε το σωστό αριθμό για κάθε κυτταρικό τύπο. Αυτό συμβαίνει διότι τα κύτταρα παράγουν σήματα για να ελέγχουν πόσο αλλά και πότε πρέπει να διαιρούνται. Εάν οποιοδήποτε από τα παραπάνω σήματα είναι ελαττωματικό ή παραλειφθεί τότε τα κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με πάρα πολύ γρήγορους ρυθμούς οδηγώντας στο σχηματισμό του καρκινικού όγκου.

Οι όγκοι σχηματίζουν ένα δικό τους αγγειακό δίκτυο, το οποίο είναι πιο πυκνό σε σχέση με το φυσιολογικό. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μία ιδιαίτερη μορφολογία και μπορούν να μεταφέρονται είτε μέσω της κυκλοφορίας

του αίματος είτε μέσω του λεμφικού συστήματος σε άλλα μέρη του σώματος. Το φαινόμενο αυτό καλείται μετάσταση και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δευτερογενών όγκων.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης προϋποθέτει τη συσσώρευση πολλαπλών και διαδοχικών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου. Η μετάλλαξη ορίζεται ως η αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων μιας μικρής περιοχής του γονιδιώματος και συνοδεύεται είτε από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας ή από μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας (Brown T.A., 2010). Οι βασικές κατηγορίες επιβλαβών παραγόντων που οδηγούν προς αυτή την κατεύθυνση είναι: η επίδραση χημικών παραγόντων, η επίδραση ακτινοβολιών όπως είναι η υπεριώδης και η ιοντίζουσα ακτινοβολία και η μόλυνση από ορισμένους ιούς (Waheed Roomi et al., 2015).

1.1.2. Πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης

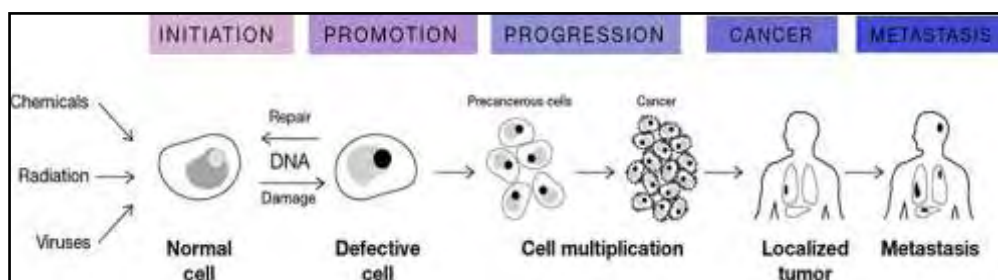
Στην σημερινή εποχή καθίσταται ολοένα και περισσότερο προφανές ότι η ανάπτυξη καρκίνου σε πολλούς ιστούς και όργανα είναι μία σταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει τροποποιημένα κύτταρα σε μία σειρά βημάτων (Farber E., Cameron R., 1980; Foulds L., 1975; Pitot, 1979). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί που απαρτίζουν την προ-καρκινική περίοδο φέρουν την εμφάνιση καρκινικών κυττάρων σε πολύ προχωρημένο στάδιο και όχι στα πρώτα βήματα. Όταν εμφανιστεί το πρώτο κακοήθες νεοπλασματικό κύτταρο, η περαιτέρω εξελικτική διαδικασία είναι πιο εύκολη να κατανοηθεί καθώς παρατηρείται η εμφάνιση επαναλαμβανόμενων κλώνων που βοηθούν στην ανάπτυξη και στην αυτονομία του καρκινικού κυττάρου (Cairns, 1975; Nowel, 1976). Ο κλωνικός πολλαπλασιασμός, επίσης, προκαλεί την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών φαινοτύπων μέσα στον όγκο, πιθανότατα μέσω επιπλέον γενετικών ή επιγενετικών αλλοιώσεων (Kerbel RS et al., 1984). Στις επίκτητες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνονται η αυτό-διατηρούμενη αντιγραφή εξαιτίας της απορύθμισης του κυτταρικού κύκλου, η εκτεταμένη κυτταρική επιβίωση μέσω της απορύθμισης της αποπτωτικής διαδικασίας και της παρατεταμένης αντιγραφής, η γενετική αστάθεια, η οποία είτε αφορά χρωμοσωμικές περιοχές είτε περιοχές με μικροδορυφόρο DNA, οι αλλαγές στη χρωματίνη, την κινητοποίηση των κυτταρικών πόρων και τις τροποποιημένες αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον (Diaz-Cano, 2012).

Η διαδικασία του μετασχηματισμού απαρτίζεται από τρεις διακριτές φάσεις (Εικόνα 1), καθεμία από τις οποίες συνεισφέρει ξεχωριστά στην δημιουργία και την πιθανή εξάπλωση του καρκινικού όγκου:

1. Το πρώτο βήμα του πολυσταδιακού μοντέλου είναι η **έναρξη (initiation)** της καρκινογένεσης. Η έναρξη αυτή οφείλεται, κατά κόρον, σε βλάβες που

έχουν προκληθεί στο DNA και δεν μπορούν να επιδιορθωθούν εξαιτίας βλάβης των ενζύμων επιδιόρθωσης. Οι βλάβες οφείλονται στις ελεύθερες ρίζες του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, τα αρχέγονο κύτταρο (*stem cell*) υφίσταται μεταλλάξεις δίνοντας έτσι γένεση σε ένα νέο κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτό-ανανέωσης (*self-renewal*) ή μπορεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων (*Trosko JE et al., 1989*).

2. Το δεύτερο βήμα ονομάζεται **προαγωγή (promotion)** και θεωρείται ότι είναι μία χρονοβόρα και αναστρέψιμη διαδικασία κατά την οποία τα προνεοπλασματικά κύτταρα συσσωρεύονται μέσω επίδρασης μιτωτικών παραγόντων. Εντός αυτής της περιόδου, η διαδικασία μπορεί να τροποποιηθεί με την απομάκρυνση του μιτογόνου παράγοντα. Ενώ, λοιπόν, υπό φυσιολογικές συνθήκες το κύτταρο στην 40^η διαίρεση πεθαίνει, στην προκειμένη περίπτωση, στις κυτταρικές διαιρέσεις συσσωρεύονται γενετικές βλάβες και ευνοείται ο κλωνικός πολλαπλασιασμός. Από όλα τα παραγόμενα κύτταρα μόνο ένα τελικά έχει την ικανότητα και μετατρέπεται στο προκαρκινικό κύτταρο, εξαιτίας της εγκαθίδρυσης μιας καταλυτικής μετάλλαξης.
3. Το τρίτο και το τελευταίο βήμα καλείται **πρόοδος (progression)**. Στη παρούσα φάση τα συνεχώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα αποκτούν μία πιο επιθετική συμπεριφορά οδηγώντας στην παραγωγή ενός όγκου με κακοήθη συμπεριφορά. Η συσσωρευμένη κυτταρική μάζα μπορεί να παρεμβαίνει στη λειτουργία των οργάνων και μάλιστα, αποκτά την ικανότητα να μεταναστεύει σε γειτονικούς ιστούς και όργανα (*Waheed Roomi et al., 2015*). Το σχετικό μοτίβο, σύμφωνα με το οποίο πραγματοποιείται η εξάπλωση του καρκινικού όγκου περιλαμβάνει το στάδιο της υπερπλασίας (αυξημένος αριθμός κυττάρων και διαιρέσεων), εισβολή σε γειτονικούς ιστούς και το φαινόμενο της μετάστασης (κυτταρική μετανάστευση σε απομακρυσμένους ιστούς) (*Hanahan D., Weinberger RA, 2000*).



Εικόνα 1: Παράγοντες που προκαλούν καρκίνο και τα στάδια μετασχηματισμού των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά (*Waheed Roomi et al., 2015*).

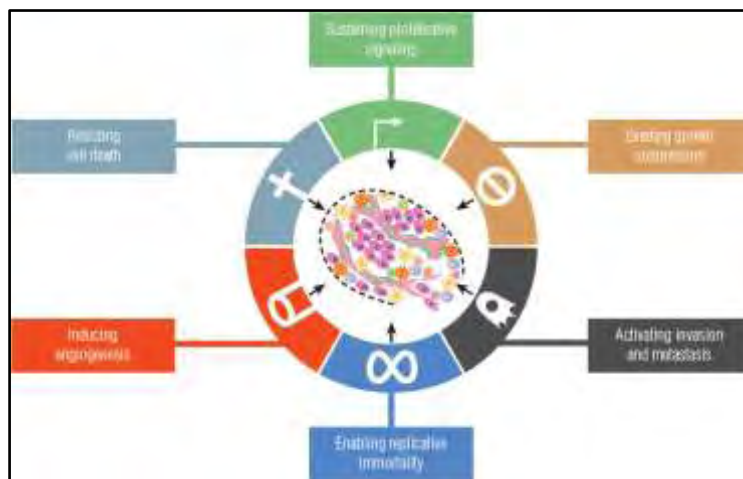
Η σύγκριση των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων αναδεικνύει γενετικές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στη δημιουργία συνθηκών αυξημένης ανάπτυξης ή αντίστασης σε σήματα, τα οποία

αναστέλλουν την ανάπτυξη ή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) κωδικοποιούνται από γονίδια που κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες : τα **ογκογονίδια (oncogenes)** και τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressors)** (Yokota J., 2000). Τα ογκογονίδια είναι υπεύθυνα για την ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων καθώς οδηγούν σε μία υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα προϊόντα ογκογονιδίων είναι πρωτεΐνες, η σύνθεση των οποίων κωδικοποιείται από τα ογκογονίδια. Εν αντιθέσει, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια, των οποίων η λειτουργία παρεμποδίζει την καρκινογένεση. Στη διάρκεια της καρκινογενετικής διαδικασίας, παρατηρείται ενεργοποίηση της δράσης των ογκογονιδίων και παρεμπόδιση της λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

1.1.3. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

Έχουν προταθεί έξι θεμελιώδεις αλλαγές που επηρεάζουν τη φυσιολογία του κυττάρου (Εικόνα 2) και συλλογικά υπαγορεύουν την ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου (Hanahan D & Weinberg R.A., 2000). Σε αυτές περιλαμβάνονται:

- Η αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες
- Η απευαισθητοποίηση των ανασταλτικών σημάτων της ανάπτυξης
- Η αποφυγή της απόπτωσης
- Η απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού
- Η διατήρηση της αγγειογένεσης
- Η διεισδυτικότητα στους ιστούς και μετάσταση.



Εικόνα 2: Επίκτητες λειτουργικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (<http://basicmedicalkey.com/cancer-treatment-and-chemotherapy/>).

Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί στους περισσότερους και ίσως σε όλους τους τύπους ανθρώπινων όγκων. Παρακάτω αναλύονται η καθεμία ξεχωριστά:

1. Αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες

Τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν μιτογόνα αναπτυξιακά σήματα (*growth signals, GF*) για τη μετάβαση από ένα στάδιο ηρεμίας σε ένα ενεργό στάδιο πολλαπλασιασμού. Αυτά τα σήματα μεταβιβάζονται στο εσωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι είναι ικανοί να αναγνωρίζουν και να προσδέσουν συγκεκριμένα σηματοδοτικά μόρια. Η εξάρτηση από τη σηματοδότηση που είναι απαραίτητη για την εξάπλωση και συνεπώς και για τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων σε ένα μέσο καλλιέργειας, είναι προφανής μόνο εάν προστεθούν οι αυξητικοί παράγοντες. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά έρχεται σε αντίθεση με εκείνη των καρκινικών κυττάρων, η οποία εμφανίζει μία σημαντικά μειωμένη εξάρτηση από εξωκυττάρια αναπτυξιακά σήματα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα σύνθεσης αυξητικών παραγόντων στους οποίους ανταποκρίνονται, δημιουργώντας ένα σηματοδοτικό βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης λόγω αυτοκρινούς διέγερσης του πολλαπλασιασμού.

2. Απευαισθητοποίηση των ανασταλτικών σημάτων της ανάπτυξης

Σε ένα φυσιολογικό ιστό, πολλαπλά σήματα αναστολής της ανάπτυξης τίθενται σε λειτουργία προκειμένου να διατηρηθεί η ηρεμία και η ομοιόσταση του κυττάρου, τα οποία μπορούν να αποφύγουν τα αρχόμενα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα σήματα αναστολής της ανάπτυξης λαμβάνονται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και συζευγνύονται με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά κυκλώματα. Τα κύτταρα αντί να οδηγηθούν στην πολλαπλασιαστική φάση του κυτταρικού κύκλου μεταβαίνουν στη φάση ηρεμίας G_0 , από όπου θα ξανά εισέλθουν στον κύκλο παρουσία των σωστών εξωκυττάρων σημάτων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα υγιή κύτταρα ανταποκρίνονται στα σήματα αναστολής μέσω του κυτταρικού κύκλου, ειδικότερα με τη βοήθεια συστατικών που κατευθύνουν τη μετάβαση του από τη φάση G_1 . Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποφύγουν αυτά τα κατασταλτικά σήματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρουσία κατάλληλων σημάτων που ρυθμίζουν τη μετάβαση ενός κυττάρου διαμέσου της φάσης G_1 , το κύτταρο μπορεί να επιλέξει αν θα περάσει τη φάση G_1 , αν θα μεταβεί στη φάση ηρεμίας G_0 ή αν θα προχωρήσει μετά τη μίτωση και θα διαιρεθεί.

Σε μοριακό επίπεδο κυρίαρχο ρόλο παίζει η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (*retinoblastoma protein, pRb*). Όταν συναντάται στην αποφωσφορυλιωμένη της κατάσταση, η pRb αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό με το να προσδέεται στους E2F μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι να ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G_1 στη φάση S (Weinberg, 1995). Η διατάραξη του μονοπατιού της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος απελευθερώνει τους E2F μεταγραφικούς παράγοντες από την πρωτεΐνη, γεγονός που οδηγεί στην

ανεξέλεγκτη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (άρση αναστολής μετάβασης από τη φάση G₁ στη φάση S).

3. Αποφυγή της απόπτωσης

Η ικανότητα των καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών να επεκτείνονται έχει προσδιοριστεί όχι μόνο από τον ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά κι από τον ρυθμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Όταν η διαδικασία της απόπτωσης διεγερθεί από ποικίλα φυσιολογικά σήματα, τότε παρατηρείται και μία σειρά καθορισμένων βημάτων. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο της αντίστασης στην απόπτωση μέσω πολλών στρατηγικών. Η πιο κοινή είναι εκείνη της απώλειας λειτουργίας, εξαιτίας μεταλλάξεων, του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Η επακόλουθη μη λειτουργική δράση του παραγόμενου προϊόντος, της πρωτεΐνης p53, συναντάται σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων όγκων (Harris, 1996). Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-PKB, που διαβιβάζει αντι-αποπτωτικά σήματα κυτταρικής επιβίωσης, φαίνεται πως κατευνάζει τη διαδικασία της απόπτωσης. Η περίσσεια ρυθμιστικών παραγόντων και μορίων τελεστών στην αποπτωτική διαδικασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή καινοτόμων αντικαρκινικών θεραπειών.

4. Απεριόριστη ικανότητα πολλαπλασιασμού

Πολλοί και ίσως όλοι οι τύποι των θηλαστικών κυττάρων φέρουν ένα εγγενές, κυτταρικά αυτόνομο πρόγραμμα που συμβάλλει στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού. Αυτό το πρόγραμμα φαίνεται πως λειτουργεί ανεξάρτητα από τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην διακυτταρική σηματοδότηση. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα σε ένα θρεπτικό μέσο καλλιέργειας φέρουν μία πεπερασμένη αντιγραφική ικανότητα (Hayflick, 1997). Μάλιστα, χαρακτηρίζονται από ένα συγκεκριμένο αριθμό διπλασιασμών όπου, έπειτα, σταματούν να μεγαλώνουν, μια διαδικασία που ονομάζεται γήρανση. Η διαδικασία της γήρανσης σε ανθρώπινους ινοβλάστες μπορεί να εξουδετερωθεί εάν ανασταλεί η δράση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRb) και ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας p53, επιτρέποντας στα κύτταρα να συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους για πολλές γενεές έως ότου να εισέλθουν σε ένα δεύτερο στάδιο που χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο και διαταραχές στη δομή των χρωμοσωμάτων. Σε αυτό το στάδιο η περιστασιακή εμφάνιση ενός κυττάρου (1 στα 10⁷ κύτταρα) θα αποκτήσει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται χωρίς όριο, μεταβαίνοντας αυτόματα στο φαινόμενο της αθανατοποίησης (Wright et al., 1989).

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η βράχυνση των τελομερών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μέτρο της γήρανσης των κυττάρων. Τα τελομερή απαρτίζονται από χιλιάδες επαναλήψεις, συγκεκριμένα από μία μικρή αλληλουχία μήκους 6 ζευγών βάσεων και εντοπίζονται στο τέλος των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια 50-100

br τελομερικού DNA σηματοδοτεί τη μέτρηση μιας γενιάς σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Η προοδευτική απώλεια των τελομερών αποδίδεται στην αδυναμία δράσης της DNA πολυμεράσης, η οποία ολοκληρώνει την αντιγραφή του 3' άκρου ενός χρωμοσωμικού DNA, στη διάρκεια της φάσης S. Αποτέλεσμα του παραπάνω γεγονότος είναι η αδυναμία προστασίας των άκρων του χρωμοσωμικού DNA και ο θάνατος του κυττάρου (*Counter et al., 1992*).

5. Διατήρηση της αγγειογένεσης

Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από το αγγειακό σύστημα είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των κυττάρων και την επιβίωση, υποχρεώνοντας σχεδόν το σύνολο σχεδόν όλων των κυττάρων σε έναν ιστό να παραμένει μέσα σε 100 μm ενός αιμοφόρου τριχοειδικού αγγείου. Όταν σχηματιστεί ο ιστός, η ανάπτυξη των νέων αιμοφόρων αγγείων, γνωστή και ως αγγειογένεση, αποτελεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη και ταυτόχρονα μεταβατική διαδικασία. Εξαιτίας αυτής της εξάρτησης από τα γειτονικά τριχοειδή θα φαινόταν πιθανό τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μέσα σε έναν ιστό να έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν αιμοφόρα αγγεία. Αλλά κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει. Τα κύτταρα με παρεκκλίνουσα πολλαπλασιαστική συμπεριφορά, αρχικά δεν έχουν την ικανότητα της αγγειογένεσης παρεμποδίζοντας έτσι την δυνατότητα τους για επέκταση. Προκειμένου να μπορέσουν να αναπτυχθούν κάποιες νεοπλασίες που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο πρέπει να αναπτύξουν την ικανότητα της αγγειογένεσης (*Folkman, 1997*).

Η αντιστάθμιση των θετικών και των αρνητικών σημάτων είναι δυνατόν να ανασταλεί ή να πυροδοτηθεί. Μία τέτοια τάξη σημάτων περιλαμβάνει διαλυτούς παράγοντες και υποδοχείς, όπου οι τελευταίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπροσθέτως, οι ιντεγκρίνες και τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, που μεσολαβούν στη αλληλεπίδραση του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Η επαγωγή της έναρξης των σημάτων της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται από τον υποδοχέα αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) και από τον υποδοχέα ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (*fibroblast growth factor, FGFR*). Καθένας από αυτούς προσδέεται σε ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης-τυροσίνης (*Veikkola and Alitalo, 1999*). Από την άλλη πλευρά, ένας πρωτοποριακός αναστολέας της αγγειογένεσης είναι η θρομβοσπονδίνη-1, που προσδέεται στον διαμεμβρανικό υποδοχέα CD36 των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Bull et al., 1994*). Είναι εμφανές πως η καρκινική αγγειογένεση προσφέρει έναν σπάνιο και ιδιαίτερο θεραπευτικό στόχο και συναντάται εξίσου στους περισσότερους τύπους ανθρώπινων καρκίνων.

6. Διεισδυτικότητα στους ιστούς και μετάσταση

Αργά ή γρήγορα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης πολλών ανθρωπίνων τύπων καρκίνου, οι αρχικές καρκινικές μάζες παράγουν κάποια πρωταρχικά κύτταρα, τα οποία μετακινούνται έξω από αυτές, διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς κι από εκεί μεταναστεύουν σε μακρινές περιοχές, όπου, ίσως, καταφέρουν να εγκαθιδρύσουν νέες αποικίες. Η μετάσταση αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου σε ένα εκτιμώμενο ποσοστό της τάξης του 90% (Sporn, 1996). Η ικανότητα για διείσδυση και μετάσταση επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να δραπετεύουν από την αρχική μάζα και να αποικούν σε νέες περιοχές του σώματος, όπου, αρχικά τουλάχιστον, δεν υπάρχει έλλειψη σε θρεπτικά συστατικά. Ο σχηματισμός της πρωτογενούς κυτταρικής μάζας-όγκου, και η επιτυχής εισβολή/διείσδυση και μετάσταση των κυττάρων βασίζονται στις προαναφερθείσες επίκτητες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων.

Η διεισδυτικότητα και η μετάσταση είναι δύο διεργασίες αρκετά περίπλοκες και οι γενετικές-βιοχημικές διαφορές παραμένουν ακόμη απροσδιόριστες. Σε μηχανιστικό επίπεδο είναι στενά συνδεδεμένες διαδικασίες, το οποίο δικαιολογεί τον αλληλοσυσχετισμό τους ως μια γενική ικανότητα-ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Και οι δύο εκμεταλλεύονται παρόμοιες λειτουργικές στρατηγικές, που περιλαμβάνουν αλλαγές στη φυσική σύζευξη των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον τους καθώς και την ενεργοποίηση εξωκυτταρικών πρωτεασών. Αρκετά είδη πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσδεση των κυττάρων μέσα σ' έναν ιστό είναι διαφοροποιημένα στα καρκινικά κύτταρα. Στις πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνονται οι CAMs (*cell-cell adhesion molecules*) και οι ιντεγκρίνες που ενώνουν τα κύτταρα με την εξωκυττάρια ύλη.

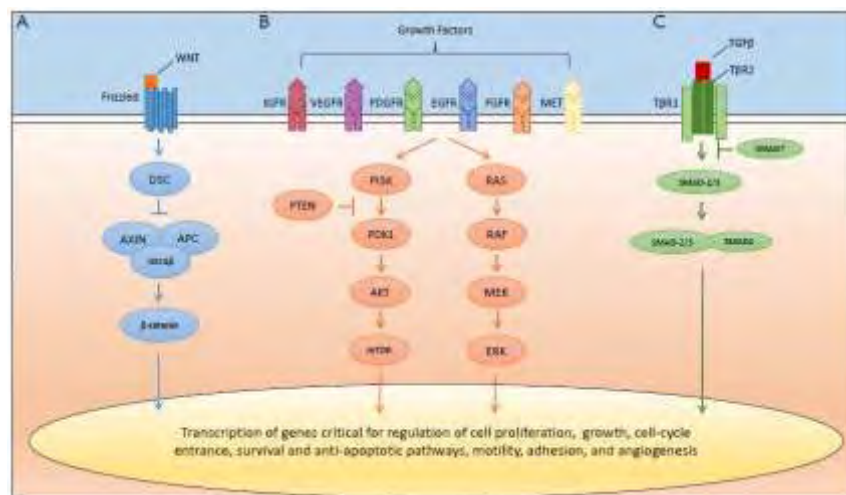
1.1.4. Ηπατοκαρκίνωμα

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (*hepatocellular carcinoma, HCC*) είναι η πιο κοινή μορφή κύριου ηπατικού καρκινώματος. Εντοπίζεται στις ανεπτυγμένες χώρες και στις ενδημικές περιοχές, με έναν υψηλό ρυθμό, στις οποίες δεσπόζει η μολυσματική ασθένεια του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV). Συγκεκριμένα ευδοκιμεί στη Νότια Ασία και στην υποσαχάρια Αφρική και προσβάλλει άτομα ηλικία 40-70 ετών, με τους άντρες να προσβάλλονται με μεγαλύτερη συχνότητα.

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου του HCC περιλαμβάνουν την μόλυνση με το ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) ή τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), την αλκοολική ηπατοπάθεια, και πολύ πιο συχνά την μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Οι περισσότεροι από τους παραπάνω οδηγούν στο σχηματισμό και στην παραγωγή της κίρρωσης του ήπατος, σε ένα ποσοστό 80-90% σε ασθενείς με HCC. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η χρόνια μόλυνση από τον HBV εκτιμάται στο 50% των

περιπτώσεων με HCC και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παιδικής ηλικίας. Στην Ασία και στην Αφρική, όπου η μόλυνση από τον HBV μεταβιβάζεται από τη μητέρα στο νεογέννητο, πάνω από το 90% των μολυσμένων ατόμων εμφανίζουν μία χρόνια πορεία, με συχνή ενσωμάτωση του HBV στο γενετικό υλικό του ξενιστή. Αν και ο HBV είναι ικανός να οδηγεί σε HCC απουσία κίρρωσης, η πλειονότητα των ασθενών (70-80%) χαρακτηρίζονται από μία συσχέτιση HCC-κίρρωση. Σημαντική κρίνεται η ανακάλυψη και η εμπορική διαθεσιμότητα του ασφαλούς και του αποτελεσματικού εμβολίου του ιού της ηπατίτιδας Β, όπου μπορεί να χορηγείται σε νεογέννητα και σε άτομα με υπερ-ευαίσθητο ανοσοποιητικό σύστημα.

Δε θα πρέπει να παραλειφθεί το γεγονός ότι η ηπατοκαρκινογένεση είναι μία πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, δια της οποίας οι υποτροπιάζοντες ηπατικοί τραυματισμοί έχουν ως επακόλουθο τη συσσώρευση γενομικών, χρωμοσωμικών και επιγενετικών φαινομένων. Τέτοιου είδους γεγονότα καθορίζουν και τον κακοήθη φαινότυπο της νόσου με την απορρύθμιση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών (Εικόνα 3). Το αυστηρώς ρυθμιζόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης που συμβάλλει φυσιολογικά στην εμβρυογένεση και στη διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων, απορρυθμίζεται στο HCC. Παρατηρούνται, επίσης, υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε αρκετούς γενετικούς τόπους, που είναι γνωστό ότι καθοδηγούν τη Wnt σηματοδότηση. Επιπλέον, τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K-AKT-mTOR και MAPK παρουσιάζουν αυξημένη λειτουργική δραστηριότητα. Η αναστολή αυτών των ανεξάρτητων καταρρακτών καταστέλλει την ανάπτυξη όγκου *in vivo* και *in vitro*. Τέλος, παρατηρείται και υπερέκφραση των υποδοχέων κινάσων τυροσίνης που αλληλεπιδρούν με τα προαναφερθέντα ογκογόνα μονοπάτια.

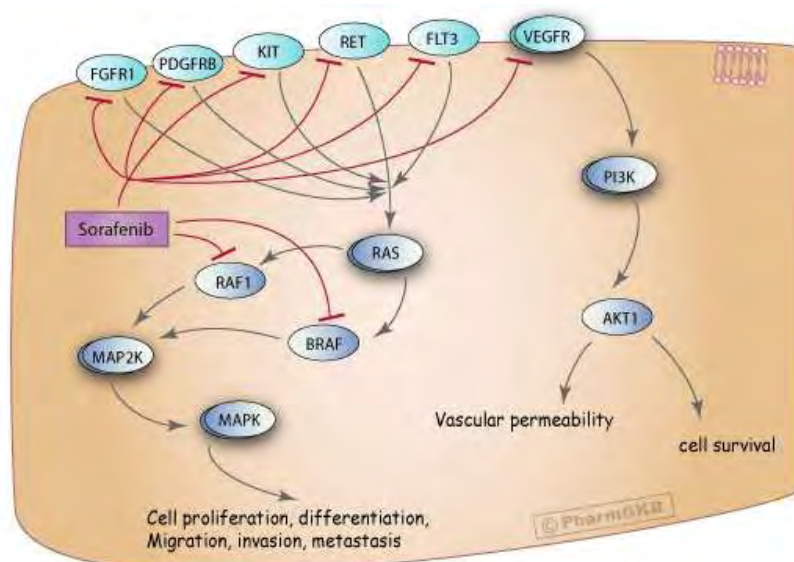


Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των καταρρακτών μεταγωγής σήματος, που σχετίζονται με τη βιολογία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (James J. Harding, Ghassan K. Abou-Alfa, 2013)

Η αντιμετώπιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος έχει συμβατικά χωριστεί σε α) θεραπευτική και β) καταπραϊντική. Θεραπευτικοί χειρισμοί,

αποτελούν η χειρουργική αφαίρεση, η μεταμόσχευση ήπατος και η διαδερμική εκτομή και αναμένεται ότι προωθούν την επιβίωση των ασθενών. Οι καταπραϋντικοί χειρισμοί δεν στοχεύουν στη θεραπεία, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε καλούς ρυθμούς ανταπόκρισης, ακόμα και να επιμηκύνουν την επιβίωση. Η χειρουργική αφαίρεση και η μεταμόσχευση επιτυγχάνουν τα καλύτερα αποτελέσματα σε επιλεγμένους ασθενείς (πενταετής επιβίωση 60-70%), και αποτελούν την πρώτη θεραπευτική επιλογή. Οι διαδερμικοί χειρισμοί παρέχουν καλά αποτελέσματα (πενταετής επιβίωση 40-50%), αλλά μπορούν να επιτύχουν ρυθμούς απόκρισης και αποτελέσματα συγκρίσιμα με τις χειρουργικές πρακτικές. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα θεωρείται γενικά ως μια ασθένεια ανθεκτική σε χημειοθεραπεία.

Μέχρι προσφάτως, δεν είχε προσδιοριστεί κάποια αποτελεσματική θεραπεία για το HCC. Το Sofarenilb είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που έχει εγκριθεί από στις ΗΠΑ για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκινώματος των νεφρών (Δεκέμβριος 2005) και του μη χειρουργικά αφαιρέσιμου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Νοέμβριος 2007). Ο χαμηλού μοριακού βάρους αναστολέας των πολλαπλών κινάσων αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αγγειογένεση με το να στοχεύει σε πολλούς διαφορετικούς τύπους σερίνης/θρεονίνης και υποδοχέων κινάσων τυροσίνης. Έχει επικαλυπτόμενη δραστηριότητα αλλά διαφέρει ως προς τη δραστικότητα του VEGFR1 (FLT1) VEGFR2 (KDR) και εμφανίζει υψηλή αναστολή ως προς τη κινάση RAF-1 του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK (Εικόνα 4). Ενώ το φάρμακο είναι γενικά ανεκτό, χαρακτηρίζεται κι από κάποιες ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως είναι το δερματικό εξάνθημα, η διάρροια και η υπέρταση.

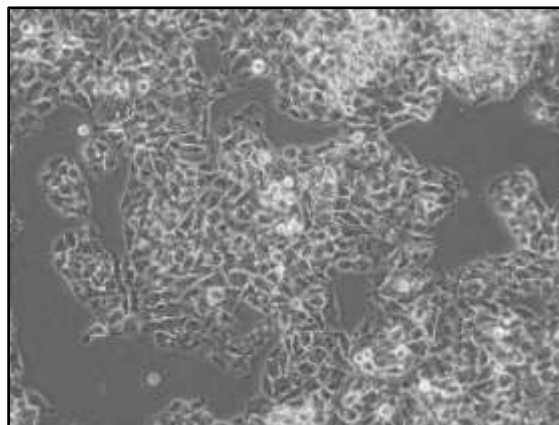


Εικόνα 4: Μηχανισμοί δράσης του φαρμάκου Sorafenib (<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165959584>).

1.1.5. Ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα, HepG2

Η κυτταρική σειρά HepG2 ανακαλύφθηκε αρχικά το 1972 από την Barbara Knowles και τους συνεργάτες της και λανθασμένα αναφέρονταν πρωτίστως σαν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (*Aden DP et al., 1979*). Μία ανθρώπινη κυτταρική σειρά κατατέθηκε το 1980 στο Ινστιτούτο Wistar της Φιλαδέλφειας ως μία καινοτόμος ιδέα. Η διαρκής αυτή κυτταρική σειρά προέρχονταν από τον ιστό του ήπατος ενός 15χρονου αγοριού καυκάσιας καταγωγής που είχε διαγνωσθεί με ένα καλώς διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και έκτοτε συγκαταλέχθηκε στην τράπεζα ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) σαν την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά (HB 8065).

Όσον αφορά τη μορφολογία τους, είναι επιθηλιακά κύτταρα, προσκολλημένα μεταξύ τους, σχηματίζοντας μονοστιβάδες εξαιτίας της δημιουργίας μικρών συσσωματωμάτων (*Εικόνα 5*). Διαθέτουν 55 χρωμοσώματα και έχει δειχθεί ότι δεν συμβάλλουν στην δημιουργία όγκων σε ποντίκια. Επιπλέον, εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία κύριων πρωτεϊνών του πλάσματος όπως είναι η αλβουμίνη, η τρανσφερίνη αλλά και πρωτεΐνες της οξείας φάσης ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται το ινωδογόνο, η άλφα-2 μακρογλοβουλίνη, η άλφα 1-αντιτρυψίνη, η τρανσφερίνη και το πλασμινογόνο. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται ύστερα από διέγερση με την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.



Εικόνα 5: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ενός 15χρονου αγοριού Λατινικής καταγωγής (<http://www.addexbio.com/productdetail?pid=46>).

Τα κύτταρα HepG2 είναι άκρως διαφοροποιημένα κύτταρα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χημικών ουσιών σε πρωταρχικό στάδιο (*Gerets et al., 2009*). Παρ' όλα αυτά ο κύριος περιορισμός τους συνδέεται με την χαμηλή μεταβολική τους ικανότητα (*Xu et al., 2004*) συγκριτικά με τα πρωταρχικά ηπατοκύτταρα που τα καθιστούν κατάλληλα για τον έλεγχο της τοξικότητας. Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα HepG2 φέρουν χαμηλά επίπεδα του κυτοχρώματος (CYPs) αλλά φυσιολογικά επίπεδα των ενζύμων της Φάσης II, με τη

μόνη εξαίρεση να αποτελεί το ένζυμο της UDP-γλυκουρονουλ-τρανσφεράσης (Westerink WMA, Schoonen WG, 2007).

2. Δευτερογενείς μεταβολίτες

2.1. Γενικά

Τα φυτά παράγουν έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών οργανικών ενώσεων που δεν φαίνεται να έχουν άμεσο ρόλο στην αύξηση και στην ανάπτυξή τους. Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές ως **δευτερογενείς μεταβολίτες (secondary metabolites)**, *δευτερογενή προϊόντα ή φυσικά προϊόντα*. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν γενικά αναγνωρίσιμους άμεσους ρόλους στις διεργασίες της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής, της μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, της διακίνησης, της σύνθεσης πρωτεϊνών, της αφομοίωσης θρεπτικών ή της διαφοροποίησης ή του σχηματισμού πρωτογενών μεταβολιτών-υδατανθράκων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τους πρωτογενείς μεταβολίτες λόγω της περιορισμένης κατανομής τους στο φυτικό βασίλειο. Δηλαδή, ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες βρίσκονται μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε ομάδα συγγενικών ειδών, ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες απαντούν σε όλο το φυτικό βασίλειο (Taiz & Zaiger 2010).

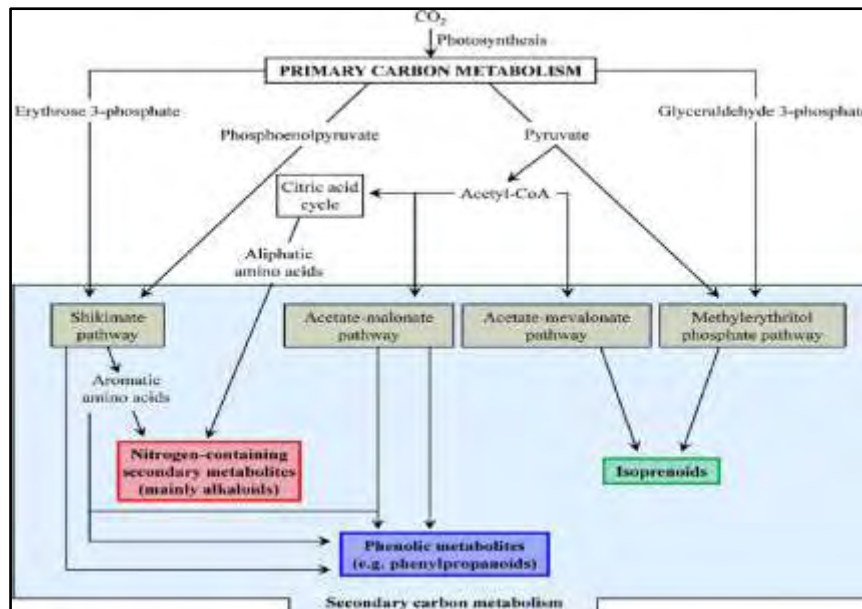
Σήμερα γνωρίζουμε ότι πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν σημαντικές οικολογικές λειτουργίες στα φυτά:

- Προστατεύουν τα φυτά έναντι φυτοφάγων οργανισμών και έναντι μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς.
- Προσελκύουν (με οσμή, χρώμα, γεύση) επικονιαστές και ζώα που συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων.
- Λειτουργούν ως παράγοντες ανταγωνισμού μεταξύ των φυτών και συμβίωσης των φυτών με μικροοργανισμούς.

Η ικανότητα ανταγωνισμού και επιβίωσης των φυτών επηρεάζεται πολύ από τις οικολογικές λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών που τα ίδια παράγουν.

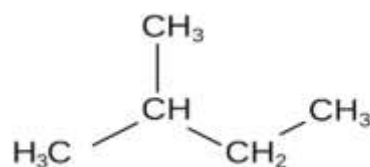
Ο δευτερογενής μεταβολισμός σχετίζεται επίσης και με τη γεωργία. Οι ίδιες αμυντικές ενώσεις που αυξάνουν την αναπαραγωγική αρμοστικότητα (fitness) των φυτών, καθώς τα προφυλάσσουν από μύκητες, βακτήρια και φυτοφάγους οργανισμούς, μπορούν επίσης να τα καταστήσουν ακατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου. Πολλά σημαντικά καλλιεργούμενα φυτά έχουν υποστεί βελτίωση, ώστε να παράγουν σχετικά χαμηλά επίπεδα δευτερογενών μεταβολιτών, που κατά συνέπεια μπορεί να τα κάνουν πιο ευάλωτα σε προσβολές από έντομα και ασθένειες.

Οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις, χημικά διακριτές ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ουσίες και τις αζωτούχες ενώσεις. Η *Εικόνα 6* δείχνει τις βιοσυνθετικές οδούς των δευτερογενών μεταβολιτών σε απλοποιημένη μορφή και τις διασυνδέσεις τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό.



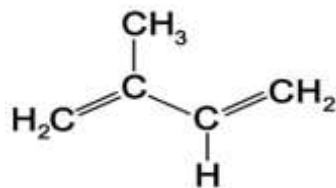
Εικόνα 6: Απλοποιημένο σχήμα των κυριότερων οδών βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η αλληλοσυσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό (https://www.researchgate.net/figure/230740348_fig1_Fig-1-Network-of-biosynthetic-pathways-and-metabolites-leading-to-the-formation-of).

Τα **τερπένια (terpenes)** ή τερπενοειδή (terpenoids), αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Οι περισσότερες από τις διαφορετικές ενώσεις της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτες στο νερό. Η σύνθεσή τους γίνεται από το ακετυλο-συνένζυμο-Α (ακέτυλο-CoA) ή ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση συστατικών με πέντε άτομα άνθρακα (ονομάζονται επίσης C_5 μονάδες) που έχουν τον διακλαδισμένο σκελετό του ισοπεντανίου:



Εικόνα 7: Χημική δομή ισοπεντανίου.

Οι βασικές μονάδες των τερπενίων μερικές φορές ονομάζονται και μονάδες ισοπρενίου (isoprene units), επειδή τα τερπένια μπορεί να αποσυντεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες και να σχηματίσουν ισοπρένιο. Κατά συνέπεια τα τερπένια μερικές φορές αναφέρονται και ως ισοπρενοειδή.



Εικόνα 8: Χημική δομή ισοπρενίου.

Τα τερπένια ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων C₅ που περιέχουν, αν και μερικές φορές μπορεί να καταστεί δύσκολη η αναγνώριση των καταλοίπων με τα πέντε άτομα άνθρακα, λόγω των εκτεταμένων μεταβολικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα αρχικά μόρια. Για παράδειγμα, τερπένια με 10 άτομα άνθρακα, που αποτελούνται από δύο μονάδες C₅, ονομάζονται *μονοτερπένια*. Τερπένια με 15 άτομα άνθρακα (τρεις μονάδες C₅) ονομάζονται *σεσκιτερπένια* και τερπένια με 20 άτομα άνθρακα (τέσσερις μονάδες C₅) ονομάζονται *διτερπένια*. Μεγαλύτερα τερπένια περιλαμβάνουν *τριτερπένια* (30 άτομα άνθρακα), *τετρατερπένια* (40 άτομα άνθρακα) και *πολυτερπενοειδή* ([C₅]_n άτομα άνθρακα, όπου n>8).

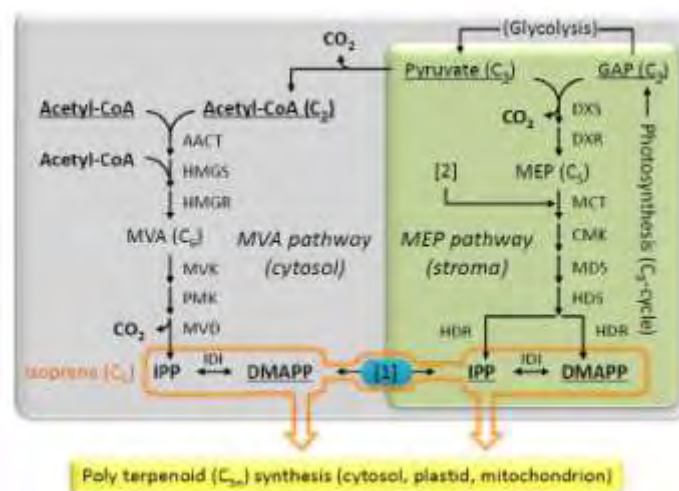
Οι **φαινολικές ενώσεις** (phenolic compounds ή **phenolics**) περιέχουν μια φαινολική ομάδα: μια λειτουργική υδροξυλομάδα πάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Δύο είναι οι κύριες οδοί σύνθεσης των φαινολικών ενώσεων. Η οδός του σικιμικού οξέος που συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων φυτικών φαινολικών ενώσεων και η οδός του μηλονικού οξέος, που αποτελεί σημαντική πηγή φαινολικών δευτερογενών προϊόντων στους μύκητες και στα βακτήρια, αλλά είναι μικρότερης σημασίας στα ανώτερα φυτά.

Οι **αζωτούχες ενώσεις** συντίθενται από τα συνήθη αμινοξέα και είναι ευρέως γνωστές για την αμυντική τους δράση έναντι φυτοφάγων ζώων. Τέτοιες ενώσεις είναι τα αλκαλοειδή και οι κυανογόνοι γλυκοζίτες. Το άτομο του αζώτου είναι συνήθως μέλος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου, ενός δακτυλίου δηλαδή που περιέχει τόσο το άτομο του αζώτου όσο και άτομα άνθρακα και προέρχεται από την αμινομάδα των αμινοξέων, από τα οποία συντίθενται οι αζωτούχες ενώσεις.

2.2. Βιοσύνθεση τριτερπενίων

Τα τερπένια συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους. Με την καλά μελετημένη οδό του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid pathway), τρία μόρια ακέτυλο-CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ (*Εικόνα 9*). Αυτή η σημαντική ενδιάμεση ένωση έξι ατόμων άνθρακα στη συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl diphosphate, IPP). Το IPP είναι η ενεργοποιημένη δομική μονάδα των τερπενίων που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα.

Το IPP μπορεί επίσης να σχηματιστεί από ενδιάμεσους μεταβολίτες της γλυκόλυσης ή του φωτοσυνθετικού κύκλου αναγωγής του άνθρακα μέσω μιας σειράς ξεχωριστών αντιδράσεων που ονομάζεται οδός της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (methylerythritol phosphate [MEP] pathway) η οποία διεξάγεται στους χλωροπλάστες και σε άλλα πλαστίδια (Lichtenthaler, 1999). Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και άλλα δύο άτομα άνθρακα που προέρχονται από το πυροσταφυλικό συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν τον ενδιάμεσο μεταβολίτη με πέντε άτομα άνθρακα τη 5-φωσφορική 1-δεοξυ-D-ξυλουλόζη. Ο ενδιάμεσος αυτός μεταβολίτης ανασχηματίζεται και ανάγεται σε 4-φωσφορική 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλη (MEP), που μετατρέπεται τελικά σε IPP (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Περίγραμμα της βιοσύνθεσης των τερπενίων. Οι βασικές μονάδες με 5 άτομα άνθρακα συντίθενται μέσω δύο διαφορετικών οδών. Τα φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα προϊόντα, IPP και DMAPP, ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν τερπένια αποτελούμενα από 10, 15 ή ακόμη και περισσότερα άτομα άνθρακα (<http://www.intechopen.com/books/photosynthesis/biosynthesis-of-lipids-and-hydrocarbons-in-algae>).

Το IPP και το ισομερές του, το διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), είναι οι ενεργοποιημένες δομικές μονάδες των 5 ατόμων άνθρακα της βιοσύνθεσης των τερπενίων που ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα μόρια. Αρχικά το IPP και το DMAPP αντιδρούν για να σχηματίσουν διφωσφορικό γερανύλιο (GPP), την πρόδρομη ένωση με 10 άτομα άνθρακα σχεδόν όλων των μονοτερπενίων. Το GPP μπορεί να ενωθεί στη συνέχεια με ένα άλλο μόριο IPP και να σχηματίσει μία ένωση με 15 άτομα άνθρακα το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP), την πρόδρομη ένωση σχεδόν όλων των σесκιτερπενίων. Προσθήκη ενός ακόμη μορίου IPP οδηγεί στο σχηματισμό μιας ένωσης με 20 άτομα άνθρακα, το διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο (GGPP) την πρόδρομη ένωση των διτερπενίων. Τελικά, τα FPP και GGPP, με διμερισμό οδηγούν στο σχηματισμό τριτερπενίων (C_{30}) και τετρατερπενίων (C_{40}), αντιστοίχως.

Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι τα σесκιτερπένια και τα τριτερπένια σχηματίζονται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος που λαμβάνει χώρα στο

κυτοδιάλυμα, ενώ τα μονο-, δι- και τετρατερπένια προέρχονται από την οδό της MEP που διεξάγεται στον χλωροπλάστη. Ωστόσο, περιστασιακά υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των δύο οδών, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό τερπενίων που είναι 'μικτής' προέλευσης όσον αφορά τη βιοσύνθεσή τους.

2.3. Βιολογικές δράσεις των τριτερπενίων στα φυτά και στον άνθρωπο

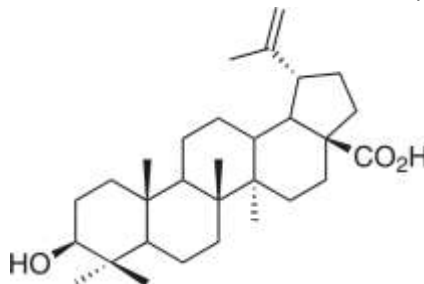
Ορισμένα τριτερπένια έχουν καλά αναγνωρισμένες δράσεις στην αύξηση ή στην ανάπτυξη των φυτών και για τον λόγο αυτόν μπορούν να θεωρηθούν μάλλον πρωτογενείς παρά δευτερογενείς μεταβολίτες. Για παράδειγμα τα βρασσινοστεροειδή είναι μία κατηγορία φυτικών ορμονών που συμμετέχουν σε λειτουργίες που ρυθμίζουν την αύξηση και προέρχονται από τα τριτερπένια. Οι στερόλες, παράγωγα των τριτερπενίων, είναι απαραίτητα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, τις οποίες σταθεροποιούν, αλληλεπιδρώντας με φωσφολιπίδια.

Τα τερπένια προστατεύουν πολλά φυτά από φυτοφάγους οργανισμούς. Μεταξύ των τριτερπενίων που παράγουν τα φυτά και χρησιμοποιούν ως αμυντικές ενώσεις έναντι φυτοφάγων σπονδυλοζώων είναι οι καρδιακοί γλυκοζίτες και οι σαπωνίνες. Οι **καρδιακοί γλυκοζίτες (*cardenolides*)** είναι γλυκοζίτες (ενώσεις που περιέχουν ένα ή περισσότερα προσαρτημένα μόρια σακχάρου), που έχουν πικρή γεύση και είναι πάρα πολύ τοξικοί στα ανώτερα ζώα. Οι **σαπωνίνες (*saponins*)** είναι στεροειδή και τριτερπενικοί γλυκοζίτες και έχουν ονομαστεί έτσι από τις σαπωνοειδείς (απορρυπαντικές) ιδιότητές τους. Πιστεύεται ότι η τοξικότητα των σαπωνινών είναι αποτέλεσμα της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με στερόλες. Οι σαπωνίνες μπορούν να παρεμποδίζουν την πρόσληψη στερολών από το πεπτικό σύστημα ή να καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες μετά την απορρόφησή τους στο αίμα.

Τα πεντακυκλικά τριτερπένια χαρακτηρίζονται, επίσης, κι από ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, μερικές από τις οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες και στον τομέα της ιατρικής και στον άνθρωπο. Πολλά τριτερπενοειδή που προέρχονται από πηγές βοτάνων φέρουν αντιφλεγμονώδη δράση (*Mansour et al., 2012*). Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα για τις αντικαρκινικές (*Muzio et al., 1996*), αντιαποπτωτικές (*Medema et al., 1997*), αντιοξειδωτικές (*Gallo M. & Sarachine M., 2009*) και αντιμικροβιακές (*Setzer et al., 2000*) τους ιδιότητες. Ανάμεσα στα πιο υποσχόμενα συστατικά συγκαταλέγονται το βετουλινικό οξύ, το ολεανικό οξύ, το μπροσβελικό οξύ, η λουπεόλη, η α και η β αμυρίνη.

2.4. Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος

Το βετουλινικό οξύ (*betulinic acid*) είναι ένα φυσικό πεντακυκλικό τριτερπενοειδές (Εικόνα 10), το οποίο παρουσιάζει μία ποικιλία βιολογικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων. Κατανέμεται ευρέως σε όλο το φυτικό βασίλειο (Cichewicz and Kouzi, 2004) με το δένδρο σημύδας (*Betula spp.*, *Betulaceae*) να αποτελεί την κύρια πηγή βετουλινικού οξέος από όπου μπορεί να απομονωθεί σε τεράστιες ποσότητες (Galgon et al., 1999; Connell et al., 1988).



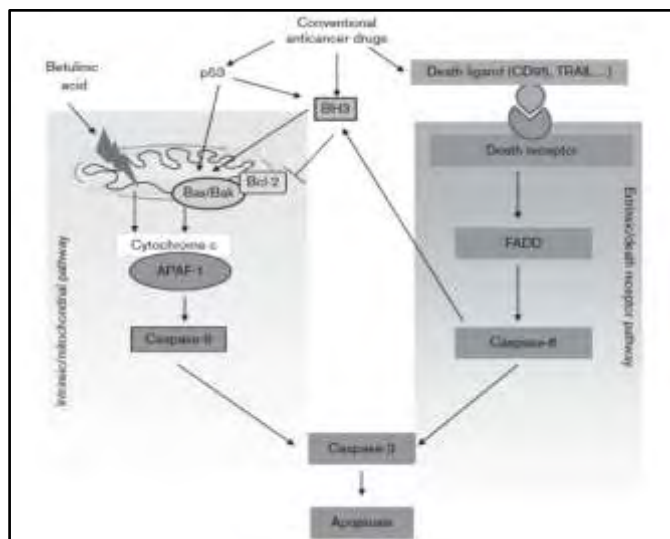
Εικόνα 10: Δομή του βετουλινικού οξέος

Το βετουλινικό οξύ είναι γνωστό για τη δράση του ενάντια στα λοιμώδη νοσήματα. Το εκχύλισμα που απομονώθηκε από τα φύλλα του φυτού *Syzgium claviflorum* (Fujjoka et al., 1994) δοκιμάστηκε σε Η9 λεμφοκύτταρα και διαπιστώθηκε ότι προκαλεί μία ανασταλτική δράση ενάντια στον διπλασιασμό του HIV (τιμή EC₅₀ 1,4 μΜ) ενώ στην ίδια συγκέντρωση δεν προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης σε μη μολυσμένα Η9 λεμφοκύτταρα (τιμή IC₅₀ 13 μΜ, δηλαδή η συγκέντρωση της ένωσης που προκαλεί 50% αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης). Το εύρημα αυτό έδωσε το έναυσμα στους επιστήμονες για τη δημιουργία παραγώγων βετουλινικού οξέος.

Αν και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι το βετουλινικό οξύ διαθέτει αντιβακτηριδιακή δράση (Eiznhamer and Xu, 2004). Σε αυτή την περίπτωση, βετουλινικό οξύ που απομονώθηκε από το φλοιό του φυτού *Syncarpia glomulifera* (*Myrtaceae*) (Setzer et al., 2000) υπέδειξε αντιβακτηριδιακή και κυτταροτοξική δράση. Βετουλινικό οξύ που απομονώθηκε από το φυτό *Zizyphus joazeiro* έδειξε σημαντική δραστηριότητα ενάντια στα Gram θετικά βακτήρια (Schühly et al., 1999).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί και η αντικαρκινική δράση που παρουσιάζει το βετουλινικό οξύ καθώς και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται. Αυτή η αντικαρκινική ιδιότητα συνδέεται με την ικανότητά του να επάγει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο πυροδοτώντας το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Μπορούν να διακριθούν δύο μονοπάτια της διαδικασίας της απόπτωσης: το εξωγενές ή νεκρό μονοπάτι του υποδοχέα (death receptor pathway) και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Εικόνα 11). Το εξωγενές μονοπάτι έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή των κασπασών 8 και 10 (Muzio et al., 1996; Medema et

al., 1997) έπειτα από την επαγωγή της σύνδεσης ενός “υποδοχέα θανάτου”. Εν αντιθέσει το μιτοχονδριακό μονοπάτι ρυθμίζεται από την πρωτεϊνική οικογένεια Bcl-2, αποτελούμενη από αντι-αποπτωτικά και προ-αποπτωτικά μέλη. Όταν διαταραχθεί η ισορροπία ανάμεσα σε αυτά τα δύο μέλη τότε παρατηρείται ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Cory and Adams, 2002).



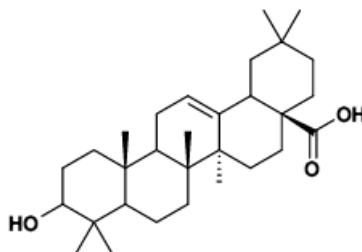
Εικόνα 11: Επαγωγή της απόπτωσης μέσω του βετουλινικού οξέος.

Το βετουλινικό οξύ, λοιπόν, δρα μέσω διατάραξης και ρήξης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η προσθήκη βετουλινικού οξέος σε απομονωμένα μιτοχόνδρια σε πειραματικά συστήματα απουσία κυττάρων οδήγησε σε αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενεργοποίηση των κασπασών και κατακερματισμό του πυρήνα μέσω της απελευθέρωσης διαλυτών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα c (Fulda et al., 1998). Επιπλέον, φαίνεται πως επιδρά σημαντικά και στα μέλη της οικογένειας Bcl-2. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση του βετουλινικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την ρυθμίζει την αύξηση της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax σε νευροβλάστωμα, γλοιοβλάστωμα και σε κύτταρα με μελάνωμα (Selzer et al., 2000). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 παρέμειναν अपαράλλαχτα κατόπιν επώασης με βετουλινικό οξύ σε κύτταρα νευροβλαστώματος, ενώ αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Bcl-2 παρατηρήθηκε σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος (Thurnher et al., 2003). Επιπλέον, η αμινοπεπτιδάση N, είναι μία διαμεμβρανική πεπτιδάση, η οποία δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα παρά μόνο σε νεοσχηματιζόμενα αγγεία. Καθώς αποτελεί έναν ρυθμιστή της αγγειογένεσης και σχετίζεται με την ογκογένεση, έχει ερευνηθεί η δυνατότητα του βετουλινικού οξέος ως αναστολέας αυτής (Petrovic et al., 2007). Τέλος, έχει προταθεί ότι ένας άλλος μηχανισμός της αποπτωτικής επίδρασης του βετουλινικού οξέος είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (Simone Fulda et al., 2009).

Η αντικαρκινική και κυτταροτοξική δράση του βετουλινικού οξέος έχει μελετηθεί εκτενώς σε ένα πάνελ καρκινικών κυτταρικών σειρών, κυρίως σε δείγματα όγκων και πειραματικά μοντέλα ποντικών όπου έχουν δεχθεί ξενομοσχεύματα. Ενώ αρχικές αναφορές υπεδείκνυαν ότι το βετουλινικό οξύ εμφανίζει επιλεκτική κυτταροτοξικότητα εναντίον κυτταρικών σειρών μελανώματος (Pisha et al., 1995), αποδείχθηκε εν συνεχεία ότι διαθέτει αντικαρκινική δράση έναντι άλλων τύπων ανθρώπινων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του νευροβλαστώματος, του γλοιοβλαστώματος, των λευχαιμιών καθώς και καρκινωμάτων σε λαιμό, κεφάλι, πνεύμονα, προστάτη, ήπαρ, ωθήκες και τράχηλο (Thurnher et al., 2003). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα φυσιολογικά κύτταρα διαφορετικής προέλευσης παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ως προς τη δράση του βετουλινικού οξέος, συμπεραίνοντας έτσι την εκλεκτικότητα του συγκεκριμένου τριτερπενοειδούς (Zuco et al., 2002). Επιπροσθέτως, η χορήγηση βετουλινικού οξέος σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού που δέχθηκε ξενομόσχευμα από καρκίνο των ωθηκών οδήγησε σε αύξηση του χρόνου επιβίωσης (Zuco et al., 2002). Τέλος, το βετουλινικό οξύ ανέστειλε την ανάπτυξη όγκου σε ένα ζωικό μοντέλο που δέχθηκε ξενομόσχευμα καρκίνου μελανώματος (Pisha et al., 1995).

2.5. Βιολογικές δράσεις ολεανολικού οξέος

Το **ολεανολικό οξύ (oleanolic acid)** είναι μία βιολογικά ενεργή πεντακυκλική τριτερπενοειδής ένωση (Εικόνα 12), η οποία έχει απομονωθεί από περισσότερα από 1620 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών τροφίμων και αρκετών φαρμακευτικών φυτών (Fukushima et al., 2011; Liu, 1995). Η ένωση είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Oleaceae*, μεταξύ των οποίων είναι το δένδρο της ελιάς, απ' όπου και πήρε το όνομά της (Simonsen and Ross, 1957). Το ολεανικό οξύ δε συναντάται στη φύση μόνο ως ένα ελεύθερο οξύ αλλά χρησιμεύει, επίσης, και ως ένα άγλυκο πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό των τριτερπενοειδών σαπωνινών, σχηματίζοντας έτσι μία ή περισσότερες αλυσίδες σακχάρου (Szakiel et al., 2005).



Εικόνα 12: Δομή ολεανολικού οξέος

Μία από τις πιο σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες που αποδίδονται στο ολεανικό οξύ είναι η ηπατοπροστατευτική του δράση. Έχει δειχθεί πως το ολεανικό οξύ δεν είναι μόνο αποτελεσματικό στην προστασία του ήπατος από τα χημικά συστατικά που επάγουν τη βλάβη του, αλλά το προστατεύει, επίσης, από την ίνωση

και την κίρρωση που προκαλείται από χρόνιες παθήσεις αυτού. Η δράση του αυτή επιτρέπει την ευρεία του χρήση στη Κίνα ως ένα φάρμακο που χορηγείται από το στόμα και είναι κατάλληλο για ανθρώπινες, ηπατικές διαταραχές όπως είναι η ιογενής ηπατίτιδα (Wang et al., 2010) . Ο μηχανισμός δράσης του, όμως, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ευρήματα έχουν αποδείξει ότι το ολεανικό οξύ είναι υπεύθυνο για την πυρηνική συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών ενζύμων, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην εξαρτώμενη επαγωγή της έκφρασης γονιδίων από τον Nrf2, που παίζουν ρόλο στην προστασία του ήπατος (Klaassen and Reisman, 2010; Liu et al., 2008).

Εκτός από την ηπατοπροστατευτική και την αντιοξειδωτική δράση, το ολεανικό οξύ αναφέρεται πως κατέχει αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Petronelli et al., 2009). Η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου και ο NF-κΒ, ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία, συνήθως υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα, καταστέλλοντας, έτσι, την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και τη διατήρηση μίας χρόνιας φλεγμονής που επωφελείται από το μικροπεριβάλλον του πολλαπλασιαστικού όγκου (Laszczyk, 2009). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δυνατότητα του ολεανικού οξέος, στοχεύοντας πιθανότατα στον NF-κΒ. Ωστόσο, δεν έχει ανακαλυφθεί ο ακριβής τρόπος δράσης του (Laszczyk, 2009).

Τέλος, το ολεανικό οξύ φέρει αντι-υπερλιπιδαιμικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, σε αρουραίους που θεραπεύτηκαν με ολεανικό οξύ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα και της λιποπρωτεΐνης σε ένα ποσοστό του 40% (Liu et al., 1987).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δράσης τριτερπενοειδών ενώσεων. Μελετήθηκαν συνολικά 32 ημισυνθετικά παράγωγα των τριτερπενοειδών βετουλινικό και ολεανικό οξύ. Απώτερος στόχος είναι η διερεύνηση των δομικών τροποποιήσεων που αυξάνουν την δραστικότητα των παραγώγων σε σχέση με τις μητρικές ενώσεις.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά

Τα αντιδραστήρια και τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες **Gibco**, **Sigma-Aldrich**, **Roche**. Συγκεκριμένα:

- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X, εταιρία Gibco, αριθμός καταλόγου 41966052). Αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βασικό μέσο για την υποστήριξη της ανάπτυξης πολλών διαφορετικών κυτταρικών σειρών θηλαστικών. Το συγκεκριμένο DMEM τροποποιείται με 4,500 mg/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ. Το DMEM δεν περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια και αυξητικούς παράγοντες, και συνεπώς απαιτείται, συνήθως, η συμπλήρωσή του με 10% Εμβρυϊκό Βόειο Ορό (Fetal Bovine Serum, FBS).
- **FBS** (Fetal Bovine Serum, εταιρία Gibco, αριθμός καταλόγου 10270106). Παρέχει στα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για την επιτυχή ανάπτυξή τους. Η τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας είναι 10% v/v (όγκο κατ' όγκον). Πριν από την χρήση του, ο ορός απενεργοποιείται με θέρμανση στους 56° C για 30 min (*heat inactivation*) ώστε να αποφευχθεί η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος στα κύτταρα της καλλιέργειας. Έπειτα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης, διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (*aliquot*), σε σωληνάρια χωρητικότητας 50 mL και αποθηκεύεται στην κατάψυξη στους -20° C.
- **Αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη** (Penicillin-Streptomycin 10,000 units/mL πενικιλίνης και 10,000 µg/mL στρεπτομυκίνης, εταιρία Gibco, αριθμός καταλόγου 15140122). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιεργειών εξαιτίας της συνδυασμένης δράσης τους ενάντια στα Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Δρουν μέσω δέσμευσης στην υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, οδηγώντας σε αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και σε θάνατο των βακτηρίων.
- **PBS** (Phosphate-buffered saline PBS, εταιρία Gibco, αριθμός καταλόγου 20012019). Αποτελεί ένα ισορροπημένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος και περιέχει 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7,2. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα έχει παρασκευαστεί χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο και χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των κυττάρων πριν από την διαδικασία της θρυψινοποίησης. Στόχος των εκπλύσεων είναι η

απομάκρυνση της περίσσειας του ορού από τη φλάσκα καλλιέργειας, η οποία δρα ανασταλτικά στη δράση του ενζύμου θρυψίνη.

- **Διάλυμα θρυψίνης 0,5% v/v (10X) σε EDTA** (Trypsin-EDTA (0.5%), εταιρία Gibco, αριθμός καταλόγου 15400054). Περιέχει 5 g/L θρυψίνη (1:250), 2 g/L EDTA 4Na, 8.5 g/L NaCl (10X). Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται ευρέως για την αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα καλλιέργειας, σε τελική συγκέντρωση 1X, έπειτα από αραίωση στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
- **DMSO** (Dimethyl Sulfoxide, εταιρία Sigma-Aldrich, αριθμός καταλόγου D2650). Το διμεθυλοσουλφοξείδιο χρησιμοποιείται κατά κόρον στη διαδικασία παγώματος των κυττάρων για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων πάγου. Συγκεκριμένα, αλλάζει τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης και προλαμβάνει την μηχανική βλάβη των κυττάρων από την κρυστάλλωση του νερού. Στο υλικό παγώματος συναντάται σε τελική συγκέντρωση 10% v/v (όγκο κατ' όγκον).
- **XTT Cell Proliferation Kit II** (εταιρία Roche, αριθμός καταλόγου 11 465 015 001). Η ανάλυση ΧΤΤ χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κυτταρικής επιβίωσης.

3.2. Φυτικές ενώσεις

Οι φυτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι 13 ημισυνθετικά παράγωγα του βετουλινικού οξέος και 19 παράγωγα του ολεανολικού οξέος.

3.3. Μέθοδοι

3.3.1. Συντήρηση κυττάρων HepG2 σε καλλιέργεια

Όλες οι μεταχειρίσεις των κυττάρων HepG2 πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας II (laminar flow hood) της εταιρείας Tel Star AV-30/70. Για την διατήρηση και τον επιτυχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων χρησιμοποιούνται επίπεδες, πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας χωρητικότητας 25 cm² (T₂₅) ή 75cm² (T₇₅). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται και μεταφέρονται σε νέα φλάσκα, πριν να φθάσει η πυκνότητα του δοχείου καλλιέργειας σε ποσοστό 80-90% καθώς αυτό θα οδηγήσει σε αναστολή της ανάπτυξης τους και θάνατο. Συνήθως η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται περίπου κάθε 3-4 μέρες.

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο αποτελείται από υλικό DMEM ενισχυμένο με την προσθήκη απενεργοποιημένου εμβρυϊκού βόειου ορού (τελικής συγκέντρωσης 10% όγκο κατ' όγκον) και με την προσθήκη των αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (τελικές συγκεντρώσεις 100 units/mL και 100 µg/mL αντίστοιχα). Πριν την χρήση τους, όλα τα αντιδραστήρια θερμαίνονται για 15-30 λεπτά, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C.

Το πλήρες θρεπτικό υλικό της κυτταρικής καλλιέργειας ανανεώνεται συνήθως κάθε 2-3 μέρες. Η μορφολογική κατάσταση της κυτταρικής σειράς ελέγχεται καθημερινά με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων (εταιρεία Kruss). Τέλος, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο (εταιρεία RS BIOTECH) σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ και σε θερμοκρασία 37° C.

Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 90% της φλάσκας καλλιέργειας παρατηρείται η δημιουργία συσσωματωμάτων που εμποδίζουν τον ομαλό πολλαπλασιασμό τους. Συνεπώς απαιτείται η ανακαλλιέργεια και το πέρασμα των κυττάρων σε νέα φλάσκα, μία διαδικασία γνωστή ως **θρυψινοποίηση**. Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι τόσο η αποκόλληση των κυττάρων από το στερεό υπόστρωμα, στο οποίο καλλιεργούνται, όσο και στην μεταξύ τους αποκόλληση, έτσι ώστε να προκύψουν εκ νέου μεμονωμένα κύτταρα. Η διαδικασία της θρυψινοποίησης αναφέρεται σε μία μικρή φλάσκα T₂₅: αρχικά, με τη βοήθεια μιας γυάλινης πιπέτας Pasteur (εταιρεία Hirschmann) προσαρμοσμένης σε αντλία κενού, αφαιρέθηκε από το δοχείο καλλιέργειας το πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε η προσθήκη 5 mL του αντιδραστηρίου Phosphate-buffered saline, 1X (**PBS**) και ανακίνηση σε όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Η προσθήκη του αντιδραστηρίου PBS αποσκοπούσε στην απομάκρυνση της περίσσειας ποσότητας του FBS, το οποίο αναστέλλει τη δράση του ενζύμου θρυψίνη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του διαλύματος PBS και προστέθηκαν 1 mL διαλύματος θρυψίνης σε EDTA, 1X (**Trypsin-EDTA**). Το ένζυμο

Θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης-θρεονίνης, που διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με το στερεό υπόστρωμα της φλάσκας. Ύστερα από μία ήπια ανάδευση, η φλάσκα καλλιέργειας τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 1-2 min προκειμένου να δράσει το ένζυμο. Εναλλακτικά, η φλάσκα μπορεί να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου και να αναδεύεται ισχυρά. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση της φλάσκας με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας μέχρι να επιτευχθεί η πλήρης διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στη φλάσκα καλλιέργειας. Η παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων επιβεβαιώνει την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων. Επιπλέον, στη φλάσκα καλλιέργειας προστέθηκαν 3-5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, με στόχο την απενεργοποίηση της θρυψίνης, και ακολούθησε μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο falcon χωρητικότητας 15 mL και επιπρόσθετη μηχανική ανάδευση, ώστε να σπάσουν πιθανά συσσωματώματα. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων, σε ταχύτητα 1000 rpm για 5 min (εταιρεία SELECTA), και μετά από την προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Τέλος, μία ποσότητα από το κυτταρικό εναιώρημα, η οποία ποικίλλει ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, μεταφέρθηκε στην ίδια ή σε νέα φλάσκα καλλιέργειας. Ο τελικός όγκος του πλήρους θρεπτικού μέσου ήταν 5 mL για μια φλάσκα καλλιέργειας T₂₅. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας πρέπει να αναγράφεται στη φλάσκα ο αριθμός και η ημερομηνία περάσματος (*passage*) της καλλιέργειας.

3.3.2. Μακροχρόνια διατήρηση κυττάρων εκτός καλλιέργειας

Η διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας είναι ένα σημαντικό κομμάτι της επιστημονικής έρευνας καθώς αποτελεί ένα αναπόσπαστο εργαλείο για την διεκπεραίωση των πειραμάτων. Το κρυοπροστατευτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την μακροχρόνια αποθήκευση των κυττάρων, αποτελείται από **πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM** και **DMSO** (διμεθυλοσουλφοξείδιο, 10 % όγκο κατ' νόγκον) ή εναλλακτικά από **εμβρυϊκό βόειο ορό FBS** και **DMSO** (διμεθυλοσουλφοξείδιο, 10% όγκο κατ' όγκον). Για την επιτυχή διατήρησή τους, είναι απαραίτητο τα κύτταρα πριν το πάγωμα να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση. Για αυτόν τον λόγο, επιλέγονται για πάγωμα κύτταρα που καλύπτουν το 60% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας.

3.3.2.1. Πάγωμα κυττάρων

Για το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία: αρχικά, αφαιρέθηκε με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur προσαρμοσμένης σε αντλία

κενού το πλήρες θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα καλλιέργειας. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος Phosphate-buffered saline, 1X (**PBS**) με στόχο την έκπλυση των κυττάρων από την περίσσεια ποσότητα του εμβρυϊκού βόειου ορού. Η ποσότητα του παραπάνω διαλύματος ποικίλλει και προσαρμόζεται κάθε φορά σύμφωνα με το εμβαδόν της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας. Ενδεικτικά, σε ένα δοχείο καλλιέργειας με εμβαδόν επιφανείας 25 cm² ή 75 cm² προστίθενται 5 mL ή 15 mL του αντιδραστηρίου PBS. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το διάλυμα PBS και προστέθηκε το ένζυμο θρυψίνη. Η ποσότητα του ενζύμου που προστίθεται ποικίλλει εξίσου ανάλογα με το εμβαδόν επιφανείας της φλάσκας καλλιέργειας. Έτσι, χρησιμοποιείται 1 mL θρυψίνης για την φλάσκα T₂₅ και 1,5 mL θρυψίνης για την φλάσκα T₇₅ και μετέπειτα τα κύτταρα είτε τοποθετούνται για 1-2 min στον επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να δράσει η πρωτεάση. Μετά την αποκόλλησή τους τα κύτταρα αναδεύονται με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας και μετά από την προσθήκη 3-5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού, για την αδρανοποίηση του ενζύμου, τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο falcon χωρητικότητας 15 mL. Μετά από φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 1000 rpm για 5 min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και τα κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με το **μέσο παγώματος** (freezing medium). Το μέσο παγώματος περιέχει 10% DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM (όγκο κατ' όγκον) ή 10 % DMSO σε FBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε κατάλληλα σωληνάκια (**cryovials**), ενδεικτικά 1 mL ανά σωληνάριο και ακολουθεί η σταδιακή ψύξη των κυττάρων, που πραγματοποιείται με μεταφορά τους για λίγες ώρες σε θερμοκρασία -20° C, και αποθήκευση σε -80° C για χρονικά διαστήματα λίγων μηνών ή σε υγρό άζωτο μακροχρόνια αποθήκευση. Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι σε κάθε cryovial πρέπει να αναγράφεται ο αριθμός του περάσματος (*passage*) και η ημερομηνία παγώματος.

3.3.2.2. Ξεπάγωμα κυττάρων

Η διαδικασία ξεπαγώματος κυττάρων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και γι' αυτό το λόγο πρέπει να διεξάγεται σε σύντομο χρονικό διάστημα για την ελαχιστοποίηση του κυτταρικού θανάτου. Καθώς το DMSO που εμπεριέχεται στο κρυοπροστατευτικό μέσο είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου απαιτείται άμεση επαναδιαλυτοποίησή του. Έτσι, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το δοχείο υγρού αζώτου ή από τους -80° C στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37° C. Η απόψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με γρήγορες κινήσεις και συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου. Το περιεχόμενο του cryovial μεταφέρθηκε σε falcon 15 mL που περιείχε 4 mL πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και ακολούθησε μηχανική ανάδευση, για την πλήρη ανάμειξη των κυττάρων, με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας. Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε μία φλάσκα καλλιέργειας T₂₅ και τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37° C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Εναλλακτικά, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται και επαναδιαλυτοποιούνται σε πλήρες θρεπτικό μέσο προτού μεταφερθούν σε νέα

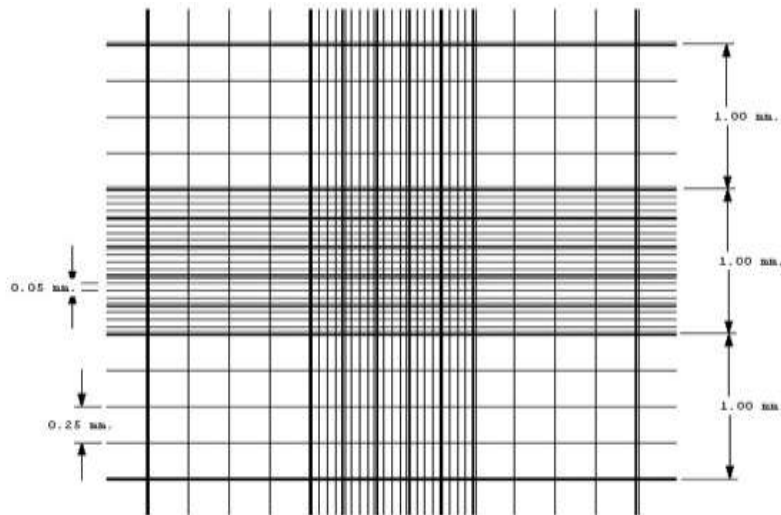
φλάσκα καλλιέργειας με πλήρες θρεπτικό μέσο. Σε κάθε φλάσκα καλλιέργειας είναι σημαντικό να αναγράφεται ο αριθμός περασμάτων (*passage*) των κυττάρων.

3.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Πριν τη διεξαγωγή ενός πειράματος είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί μέτρηση των κυττάρων που έχουν αναπτυχθεί στη φλάσκα καλλιέργειας. Η διαδικασία που ακολουθείται αρχικά έχει αναλυθεί προηγουμένως: αρχικά απομακρύνεται το πλήρες θρεπτικό υλικό, ξεπλένεται η φλάσκα με PBS, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα θρυψίνης και αφού προστεθεί πλήρες θρεπτικό υλικό για την αδρανοποίηση της θρυψίνης τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, σε ταχύτητα 1000 rpm για 5 min και επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Από το προκύπτον κυτταρικό εναιώρημα, μεταφέρθηκαν 10 μl στο αιμοκυτταρόμετρο (**Neubauer**) για την μέτρηση των κυττάρων και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι υπολογισμοί, που προσαρμόζονται πάντα σύμφωνα με τις ανάγκες του πειράματος.

Το αιμοκυτταρόμετρο, ή αλλιώς γνωστό και ως πλάκα Neubauer, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος πλάκα με τη δική της καλυπτρίδα που έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος αλλά και για άλλες μικροσκοπικές δομές ή κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας. Η αντικειμενοφόρος αυτή πλάκα είναι ουσιαστικά ένα παχύ στρώμα γυαλιού, το μέγεθος της οποίας φέρει τις διαστάσεις 30x70x4mm. Η περιοχή μέτρησης αποτελείται από δύο λείες επιφάνειες ενώ παρατηρούνται και κοίλες επιφάνειες σχηματίζοντας το γράμμα Η.

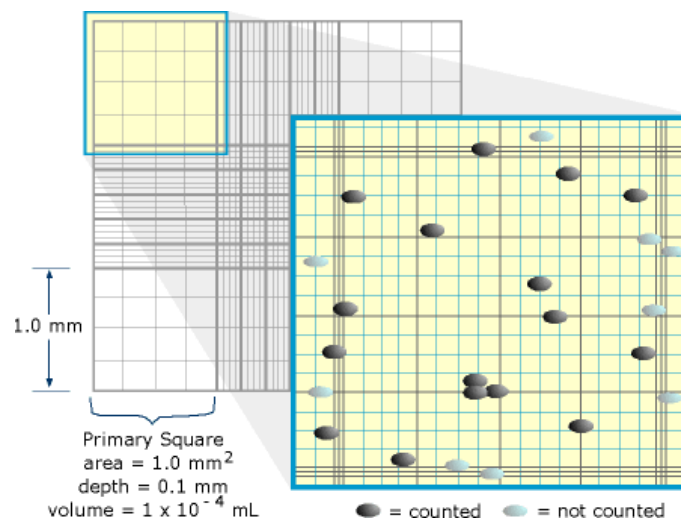
Κάθε μία από τις λείες επιφάνειες φέρει ένα τετράγωνο πλέγμα, τα οποίο αποτελείται από εννιά κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (*Εικόνα 13*). Η μεγαλύτερη κεντρική περιοχή χωρίζεται σε 25 τετράγωνα μεσαίου μεγέθους, τα οποία με τη σειρά τους διαχωρίζονται περαιτέρω σε 16 τετράγωνα. Για την μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιούνται μόνο τα 4 γωνιακά τεταρτημόρια. Το κάθε ένα από αυτά, ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα. Επίσης, κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων.



Εικόνα 13: Σχήμα στην επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου που βοηθά στη μέτρηση των κυττάρων.

Αφού τοποθετηθεί η πλάκα Neubauer στο ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων και προσαρμοστεί εξίσου και ο αντικειμενικός φακός σε εστίαση 10X, η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής: μετράται ο συνολικός αριθμός και στα 4 γωνιακά τεταρτημόρια και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών (Εικόνα 14). Το τελευταίο αριθμητικό αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με 10^4 προκειμένου να υπολογισθεί ο αριθμός των κυττάρων που υπάρχουν ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος. Ο τύπος που χρησιμοποιείται δίνεται παρακάτω:

$$\text{κύτταρα} / \text{mL} = A + B + \Gamma + \Delta / 4$$

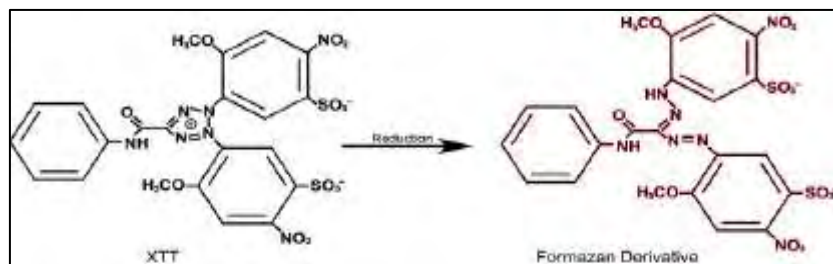


Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση του υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων στο κάθε γωνιακό τεταρτημόριο του πλακιδίου Neubauer (<http://simulab.ltt.com.au/4/laboratory/studynotes/SNHaemo.htm>).

3.5. Προσδιορισμός της κυτταρικής ανάπτυξης και απόπτωσης με τη μέθοδο ΧΤΤ

α. Αρχή της μεθόδου

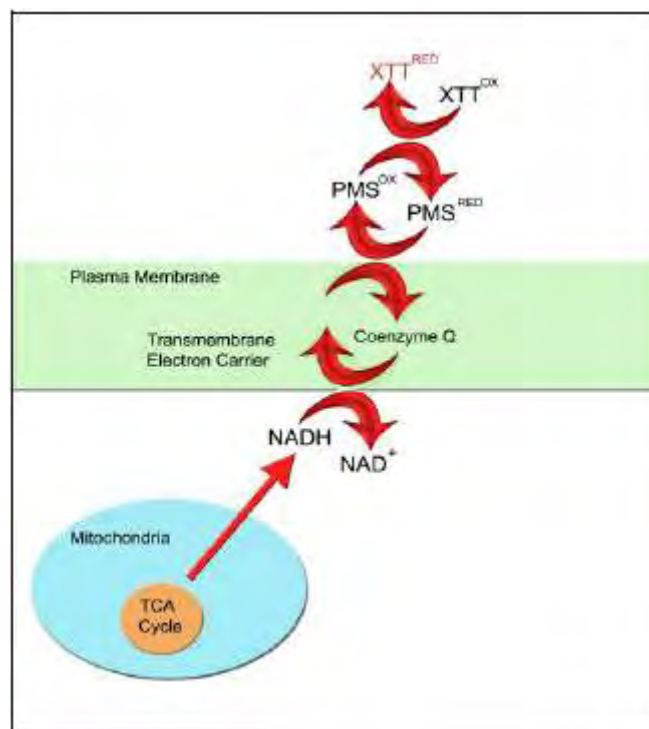
Η μη-ραδιενεργή, χρωματομετρική ανάλυση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ΧΤΤ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 από τον Scudiero (*Paull et al., 1988; Scudiero, et al., 1988*) και τους συνεργάτες του σαν μία αποτελεσματική φασματοφωτομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης της κυτταρικής ανάπτυξης και βελτιώθηκε μέσα στα επόμενα χρόνια από τους συνεργάτες του. Το ΧΤΤ είναι ένα άχρωμο ή ένα ελαφρώς κίτρινο συστατικό που όταν μειώνεται οδηγεί στην παραγωγή ενός πορτοκαλί χρώματος. Αυτή η αλλαγή του χρώματος επιτυγχάνεται με το σπάσιμο του θετικά φορτισμένου τεταρτοταγούς δακτυλίου της τετραζόλης (Εικόνα 15) οδηγώντας στην παραγωγή ενός διαλυτού προϊόντος, της φορμαζάνης (*Berridge et al., 2005*).



Εικόνα 15: Μεταβολισμός του ΧΤΤ και παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος φορμαζάνη.

Η χρήση του ΧΤΤ στα κύτταρα θεωρούνταν ότι έπρεπε να απαγορευτεί εξαιτίας του αρνητικού του φορτίου (*Berridge et al., 2005*). Οι μιτοχονδριακές οξειδοαναγωγικές ή οξειδοαναγωγικές θεωρείται ότι συμβάλλουν ουσιαστικά στην απόκριση του ΧΤΤ μαζί με τους αναγωγικούς του παράγοντες με το να μεταφέρονται έτσι στην πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 16). Έχει προταθεί πως οι δοκιμασίες με τη μέθοδο ΧΤΤ μετρούν κατά κόρον την οξειδωτική κατάσταση του νουκλεοτιδίου πυριδίνη (*Berridge et al., 2005; Marshall et al., 1999*). Ωστόσο, το ΧΤΤ μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του σε μία αντίδραση ανίχνευσης αλλά τα αποτελέσματα του δεν είναι ορατά. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ΧΤΤ βελτιώνονται σημαντικά όταν μεσολαβεί ένας ενδιάμεσος δέκτης ηλεκτρονίων, όπως το PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate), ένα ενεργό χημικό αντιδραστήριο που εμπεριέχεται στο ΧΤΤ Proliferation Kit. Ευρήματα υποδηλώνουν ότι το PMS μεσολαβεί στη μείωση της συγκέντρωσης του ΧΤΤ με το να συλλέγει τα ηλεκτρόνια από την κυτταρική επιφάνεια ή από μία θέση στην πλασματική μεμβράνη που είναι εύκολα προσιτή και να σχηματίζει ένα ραδιενεργό ενδιάμεσο, το οποίο μετέπειτα μειώνει το ΧΤΤ και οδηγεί στην παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος της φορμαζάνης. Συνεπώς, μια αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συνολικής δραστηριότητας των

μιτοχονδριακών οξειδοαναγωγασών στο δείγμα και αυτή η αύξηση αντιπροσωπεύεται άμεσα από την ποσότητα της πορτοκαλί φορμαζάνης που σχηματίζεται. Η χρωστική της φορμαζάνης μπορεί άμεσα να ποσοτικοποιηθεί από ένα φασματοφωτόμετρο ELISA (ELISA reader). Αυτό εξασφαλίζει έναν υψηλό αριθμό ακρίβειας, δίνοντας τη δυνατότητα για την συλλογή και την επεξεργασία των δεδομένων και ως εκ τούτου επιτρέπει τη γρήγορη και εύκολη διαχείριση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



Εικόνα 16: Ο χρωματομετρικός μεταβολισμός του XTT από κυτταρικά ένζυμα.

Η μέθοδος αυτή φέρει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Είναι μία εύκολη τεχνική καθώς δεν απαιτεί περαιτέρω βήματα πλύσης και την προσθήκη επιπλέον αντιδραστηρίων. Επίσης, το γεγονός πως δε χρησιμοποιεί ραδιενεργά ισότοπα την καθιστούν ασφαλή. Τέλος, μπορεί να χαρακτηριστεί αφενός ευαίσθητη διότι ανιχνεύει ακόμη και πολύ μικρούς αριθμούς κυττάρων και αφετέρου ιδιαίτερα ακριβής καθώς η φασματοφωτομετρική απορρόφηση συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Η ανάλυση αυτή βρίσκει εφαρμογή στην μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και θρεπτικά συστατικά αλλά και στην μέτρηση της κυτταροτοξικότητας.

β. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων που βασίζεται στη μέθοδο XTT

Ο προσδιορισμός της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων με τη μέθοδο XTT διαρκεί 4 ημέρες και η πειραματική διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Αρχικά, την πρώτη ημέρα πραγματοποιήθηκε η επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων

σε τρυβλίο 96 θέσεων (96 well plate). Μετά από πείραμα τιτλοδότησης, στο οποίο διαφορετικός αριθμός κυττάρων επώαστηκε με διαφορετικούς χρόνους με το αντιδραστήριο ΧΤΤ επιλέχθηκε τα 30.000 κύτταρα ως ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων ανά πηγαδάκι σε τρυβλίο 96-θέσεων. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι τα κύτταρα στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πρέπει να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση, δηλαδή να καλύπτουν ομοιόμορφα περίπου το 40%-60% του τρυβλίου καλλιέργειας.

Μετά την πειραματική διαδικασία της θρυψινοποίησης υπολογίστηκε με τον ενδεικτικό τύπο που αναφέρθηκε παραπάνω (βλ. *Μέτρηση αριθμού κυττάρων με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου*) ο αριθμός των κυττάρων ανά mL κυτταρικού εναιωρήματος. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο όγκος του διαλύματος που περιέχει 30.000 κύτταρα και συμπληρώθηκε σε τελικό όγκο 150 μl ανά πηγαδάκι, σε πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM εμπλουτισμένο με τον ορό FBS και τα αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Έπειτα, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στα πηγαδάκια 96 θέσεων και τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37° C εμπλουτισμένη με 5% CO₂, για 24 ώρες με στόχο την προσκόλληση τους στον πάτο του πιάτου καλλιέργειας.

Την δεύτερη ημέρα πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία ενός μίγματος που περιείχε θρεπτικό υλικό DMEM με αντιβιοτικά, απουσία FBS, καθώς και την υπό μελέτη ουσία, σε τελικό όγκο 100 μl. Όλες οι φυτικές ενώσεις δοκιμάστηκαν σε τελική συγκέντρωση 10 και 25 μM, τουλάχιστον εις διπλούν (2 wells/compound). Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε προσεκτικά το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM και ακολούθησε η προσθήκη του κάθε δείγματος ανά πηγαδάκι. Εκτός από τις εξεταζόμενες ουσίες, τα κύτταρα επώαστηκαν και με ένα μίγμα ελέγχου (control), το οποίο περιείχε θρεπτικό υλικό DMEM με αντιβιοτικά, απουσία FBS, και DMSO, το οποίο ήταν ο διαλύτης των υπό μελέτη ενώσεων. Το πιάτο καλλιέργειας μεταφέρθηκε στον επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37° C εμπλουτισμένη με 5% CO₂, για 48 ώρες. Στο διάστημα αυτό των 48 ωρών, κάνοντας χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων, παρατηρήθηκε και σημειώθηκε η μορφολογική κατάσταση των κυττάρων, ιδιαιτέρως σε εκείνα τα πηγαδάκια που παρατηρούνταν κυτταρικός θάνατος. Τα νεκρά κύτταρα είχαν την τάση να αποκολλούνται από τον πάτο του τρυβλίου και εμφάνισαν ένα χαρακτηριστικό στρογγυλό σχήμα.

Το τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε την τέταρτη ημέρα με την προσθήκη του αντιδραστήριου ΧΤΤ. Χρησιμοποιήθηκε το **XTT Cell Proliferation Kit II** της εταιρείας Roche που περιείχε δύο αντιδραστήρια: ένα αντιδραστήριο *πορτοκαλί χρώματος*, το **XTT labeling reagent**, το οποίο περιέχει 1 mg/mL (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 χωρίς την παρουσία της χρωστικής ερυθρό της φαινόλης και ένα αντιδραστήριο *κίτρινου*

χρώματος, το **Electron-coupling reagent**, το οποίο περιέχει 0,383 mg/mL PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) σε αποστειρωμένο PBS. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τα δύο αυτά αντιδραστήρια παρασκευάζονταν σε αναλογία 50:1 (XTT labeling reagent : Electron-coupling reagent) και αναμειγνύονταν αρκετά. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl ανά πηγαδάκι και μετά από ανάδευση τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C με 5% CO₂. Τέλος, τα δείγματα φασματοφωτομετρήθηκαν σε 450 και 630 nm σε ELISA plate reader (Biotek) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Gen5 (Biotek).

3.6. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το ειδικό πρόγραμμα *Microsoft Excel 2010* και υπολογίστηκε για κάθε εξεταζόμενη φυτική ένωση το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με δείγματα ελέγχου. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται παρακάτω:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{O.D. \text{ δείγματος ελέγχου} - O.D. \text{ δείγματος}}{O.D. \text{ δείγματος ελέγχου}} * 100$$

Όπου:

- **O.D. δείγματος ελέγχου:** ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων ελέγχου (control). Η απορρόφηση του κάθε δείγματος ελέγχου υπολογίστηκε από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm στα δείγματα που περιέχουν μόνο κύτταρα, απουσία φυτικής ουσίας.
- **O.D. δείγματος:** ο μέσος όρος της τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης φυτικής ουσίας υπολογίστηκε από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 630 nm από την απορρόφηση στα 450 nm για κάθε δείγμα κυττάρων που επωάστηκε με τις υπό μελέτη ουσίες.

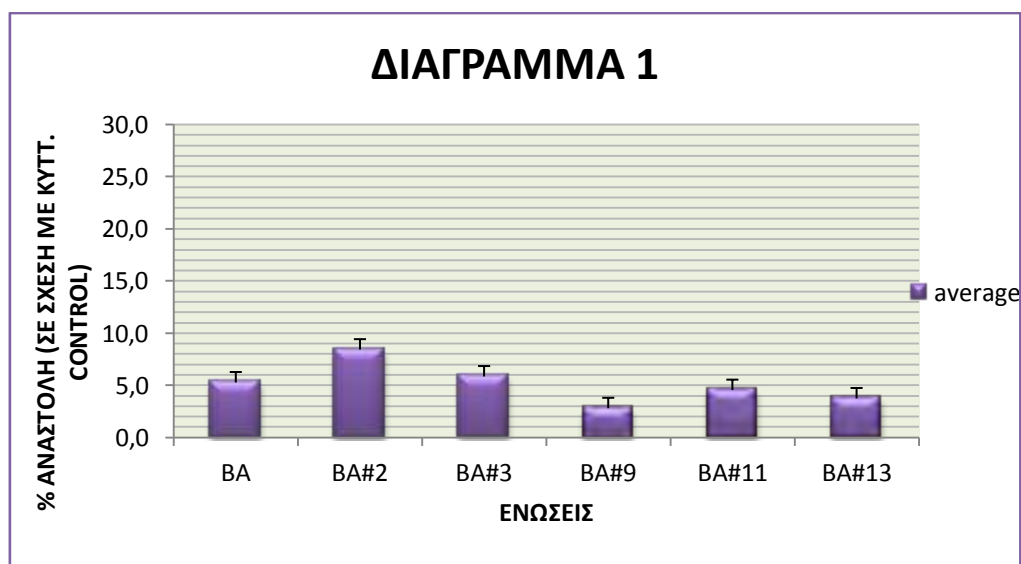
Να σημειωθεί ότι κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν και έπειτα υπολογίστηκε ο μέσος όρος του εκατοστιαίου ποσοστού κυτταρικού θανάτου της κάθε εξεταζόμενης φυτικής ουσίας σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Στη συνέχεια, τα % ποσοστά αναστολής των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση, με τη βοήθεια της μεθόδου Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent Student's t-test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

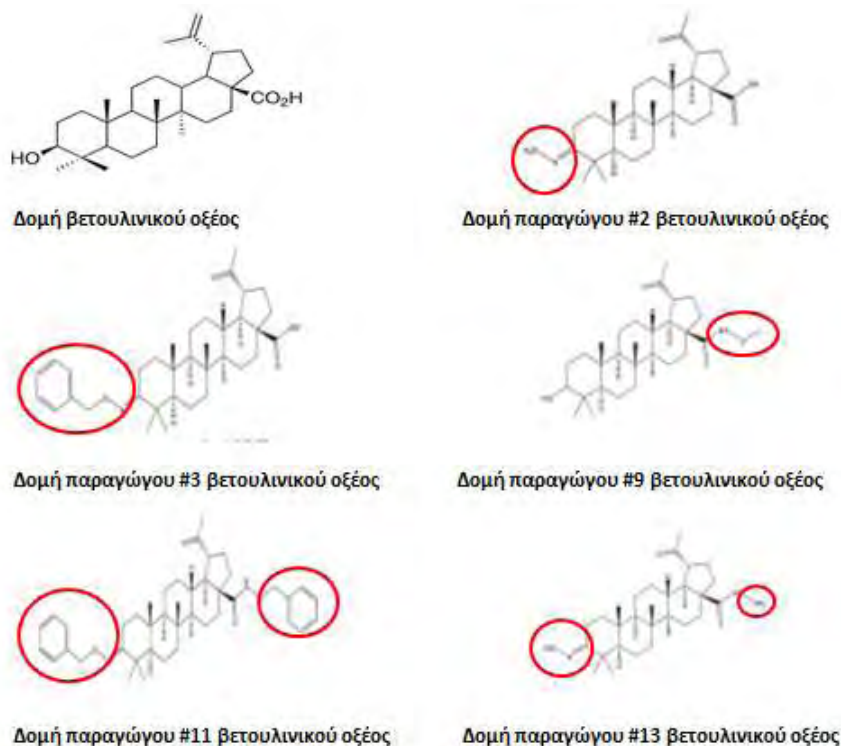
Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα δευτερογενών μεταβολιτών, που είχαν απομονωθεί από φυτικούς οργανισμούς και συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν τα παράγωγα του βετουλινικού και του ολεανολικού οξέος στο πλαίσιο διερεύνησης της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης που προκαλούν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 (ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα).

Συγκεκριμένα, η γενική ιδέα του όλου πειραματικού σχεδιασμού ήταν η εικοσιτετράωρη επώαση κυττάρων HepG2 με τα υπό εξέταση ημισυνθετικά τριτερπενοειδή, αρχικά, σε τελική συγκέντρωση 25 μ M στα καρκινικά κύτταρα. Για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης, οι ενώσεις αραιώθηκαν με θρεπτικό DMEM και αντιβιοτικά, απουσία ορού. Μετά το πέρας του 48ώρου πραγματοποιήθηκε χρήση της μεθόδου ΧΤΤ.

Παράγωγα βετουλινικού οξέος

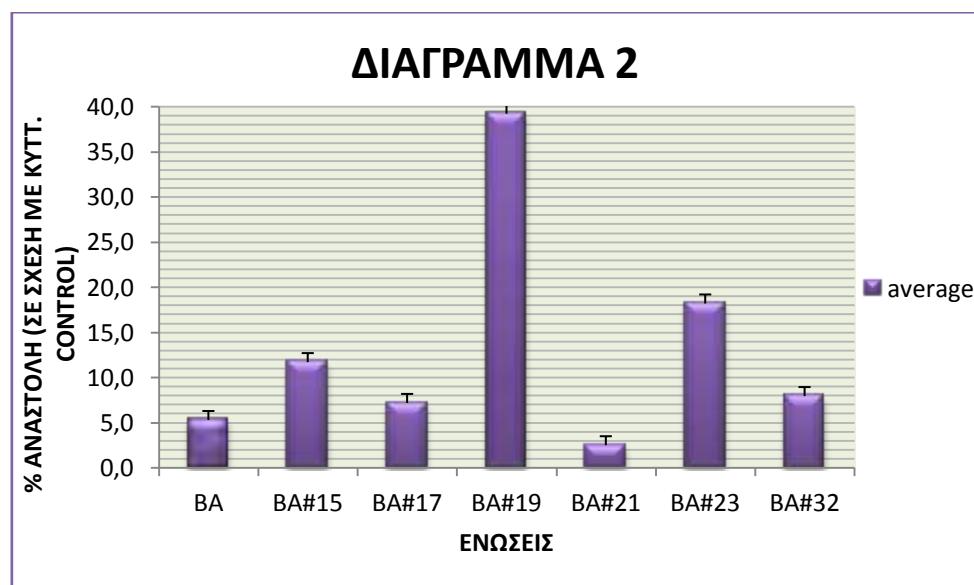


Διάγραμμα 1: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα βετουλινικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.

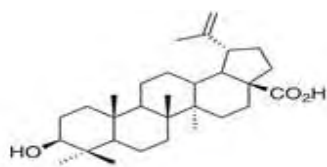


Εικόνα 17: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #2, #3, #9, #11 και #13 του βετουλινικού οξέος σε σχέση με το αρχικό μόριο.

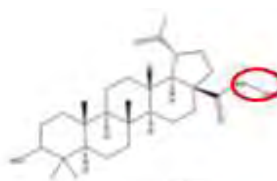
Όπως παρατηρείται από το *διάγραμμα 1* τα παράγωγα #2, #3, #9, #11 και #13 του βετουλινικού οξέος προκάλεσαν 8,4%, 5,8%, 2,8%, 4,5% και 3,7% αντίστοιχα αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, τιμές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Οι συγκεκριμένες δομικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στα παράγωγα του βετουλινικού οξέος φαίνεται πως δεν ενισχύουν τη δραστηριότητα της αρχικής ένωσης.



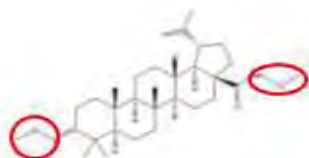
Διάγραμμα 2: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα βετουλινικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.



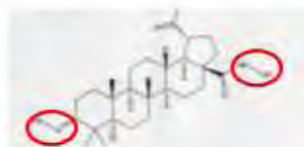
Δομή βετουλινικού οξέος



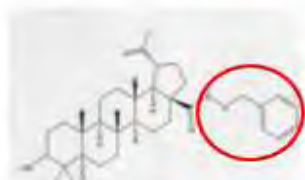
Δομή παραγώγου #15 βετουλινικού οξέος



Δομή παραγώγου #17 βετουλινικού οξέος



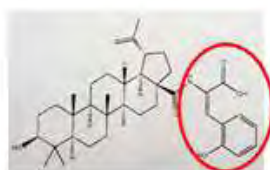
Δομή παραγώγου #19 βετουλινικού οξέος



Δομή παραγώγου #21 βετουλινικού οξέος



Δομή παραγώγου #23 βετουλινικού οξέος

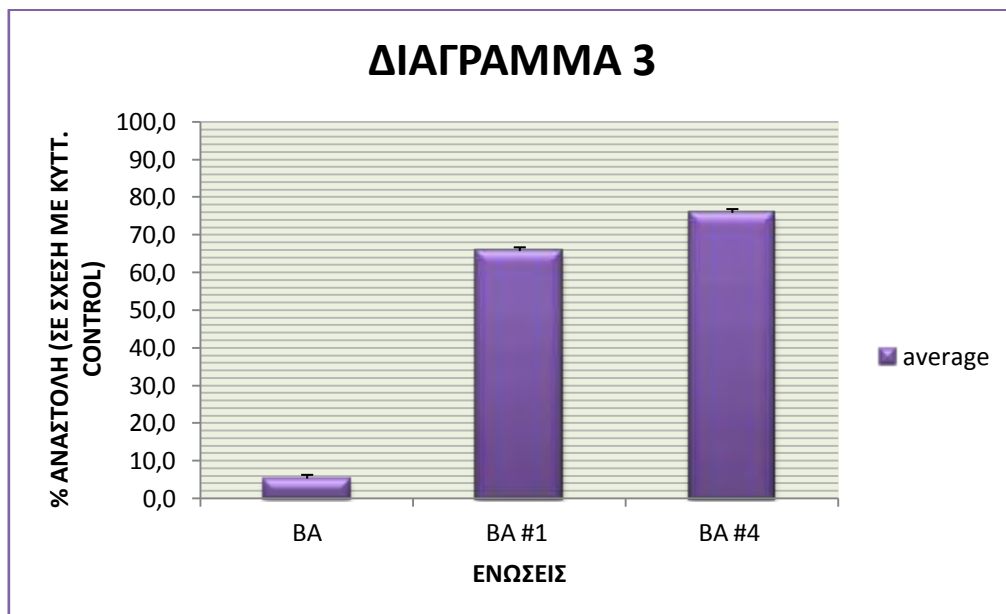


Δομή παραγώγου #32 βετουλινικού οξέος

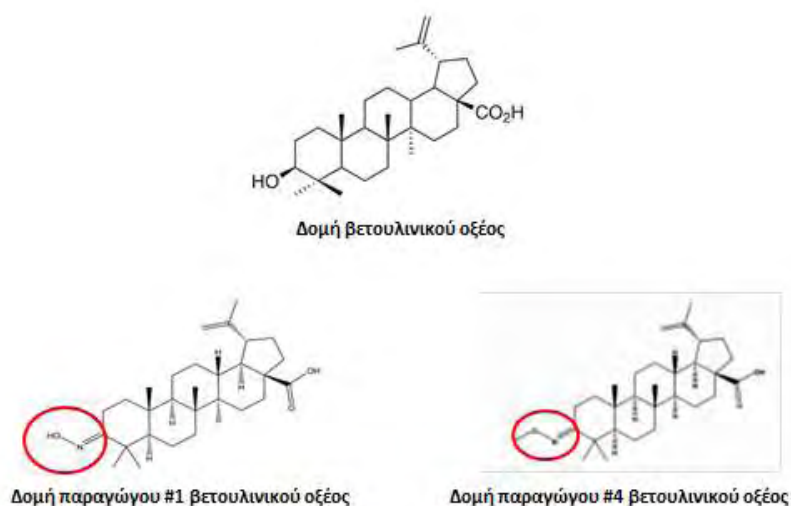
Εικόνα 18: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #15, #17, #19, #21, #23 και #32 του βετουλινικού οξέος σε σχέση με το αρχικό μόριο.

Παρομοίως, σύμφωνα με το *διάγραμμα 2*, τα ημισυνθετικά παράγωγα #15, #17, #19, #21, #23 και #32 προκάλεσαν αντίστοιχα μικρή και μη στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστά 11,7%, 7,1%, 39,2%, 2,5%, 18,2% και 7,9% συμπεραίνοντας ότι τα παράγωγα αυτά οδηγούν σε μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, από τα παράγωγα του βετουλινικού οξέος που εξετάστηκαν, μόνο δύο υπέδειξαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στη κυτταρική σειρά HepG2 σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.



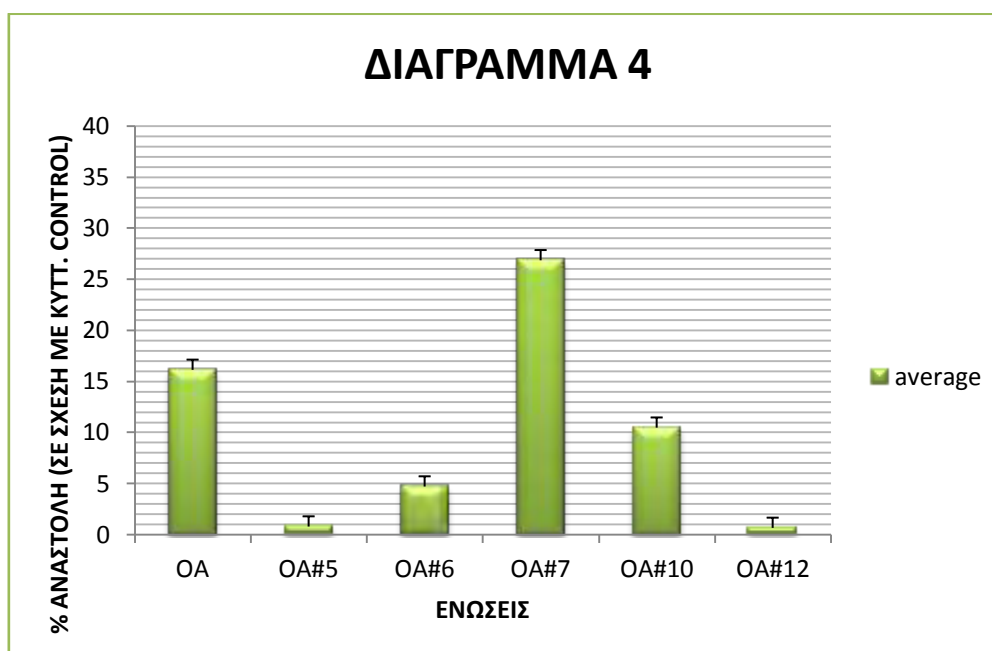
Διάγραμμα 3: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα βετουλινικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.



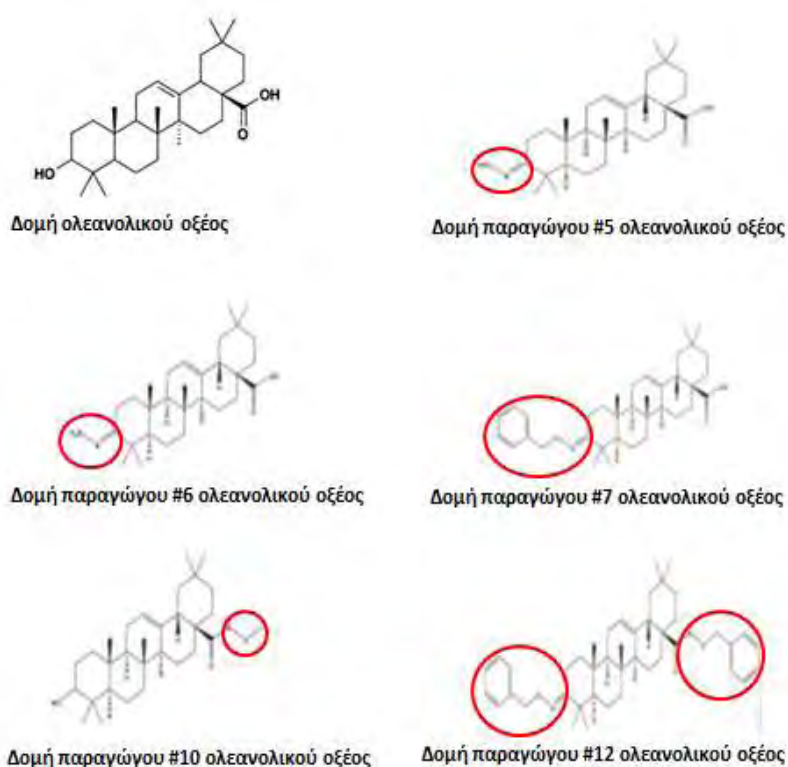
Εικόνα 19: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #1 και #4 του βετουλινικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Οι δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #1 και #4 του βετουλινικού οξέος οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των ημισυνθετικών ενώσεων σε σύγκριση με το αρχικό μόριο, με τιμές 65,7% και 75,8%.

Παράγωγα ολεανολικού οξέος



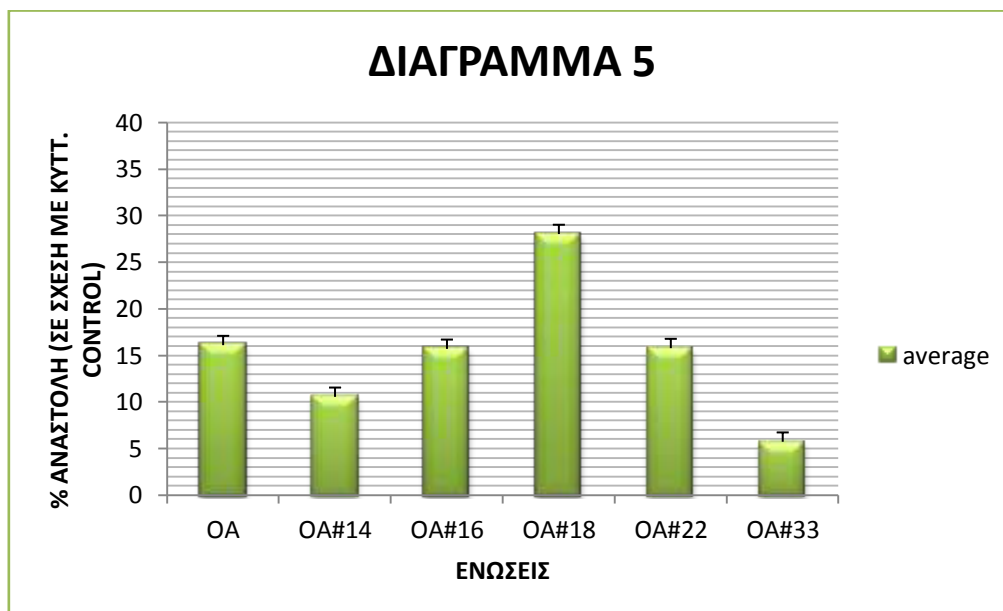
Διάγραμμα 4: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.



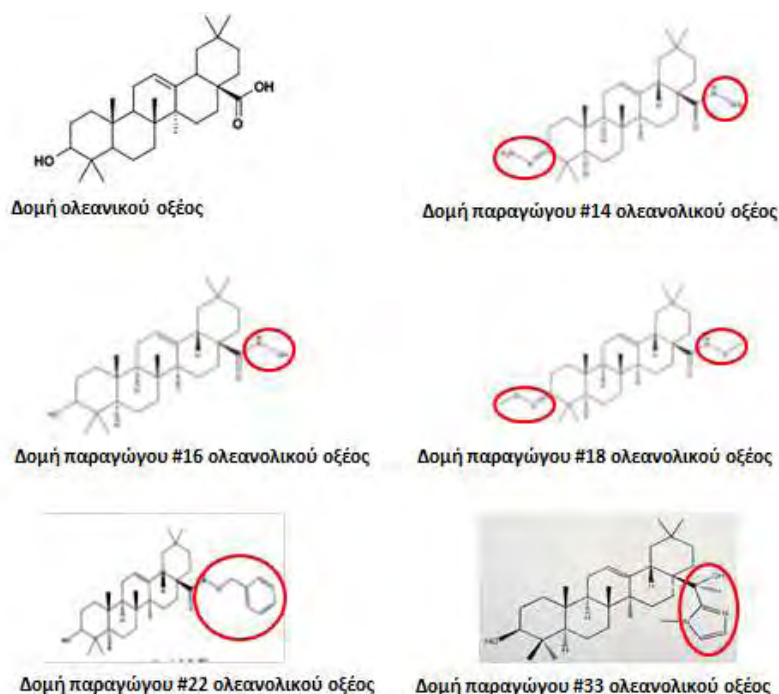
Εικόνα 20: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #5, #6, #7, #10 και #12 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Συνεχίζοντας με το *διάγραμμα 4* που αφορά το ολεανολικό οξύ, παρατηρούμε ότι τα παράγωγα #5, #6, #7, #10 και #12 του ολεανολικού οξέος προκάλεσαν 0,7%, 4,7%,

26,8%, 10,4%, 0,6% αντίστοιχα αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, τιμές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Συνεπώς, οι δομικές τροποποιήσεις στα συγκεκριμένα παράγωγα δεν αρκούν στην ενίσχυση της δραστηριότητας σε σχέση με το αρχικό μόριο.

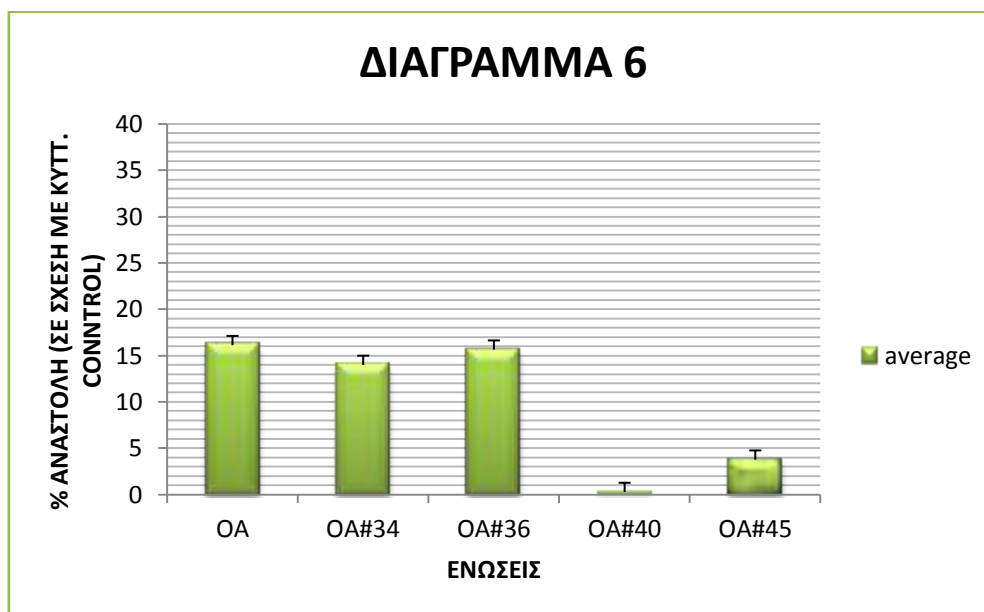


Διάγραμμα 5: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.

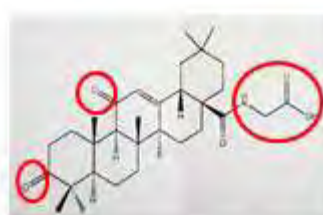
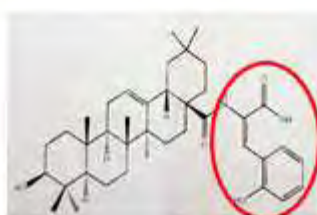
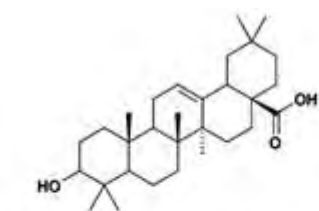


Εικόνα 21: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #14, #16, #18, #22 και #33 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Ομοίως, οι ημισυνθετικές ενώσεις #14, #16, #18, #22 και #33 του ολεανολικού οξέος προκάλεσαν μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 με τιμές 10,5%, 15,7%, 28%, 15,8% και 5,7% αντίστοιχα.

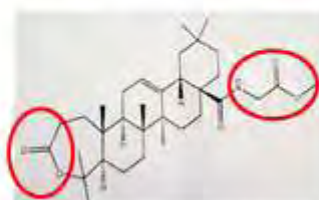


Διάγραμμα 6: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μM .



Δομή παραγώγου #36 ολεανολικού οξέος

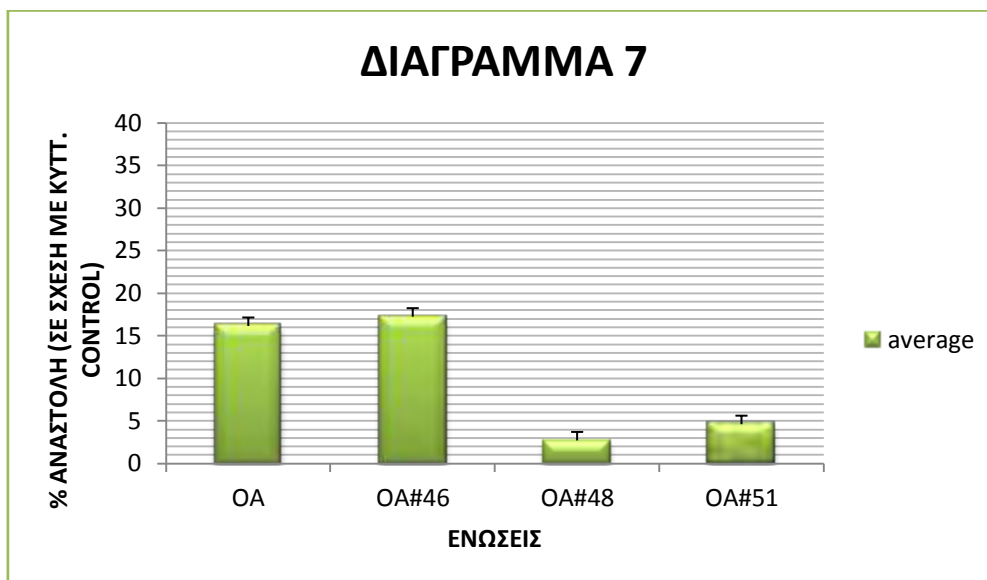
Δομή παραγώγου #40 ολεανολικού οξέος



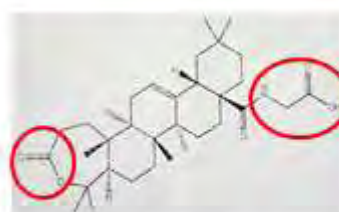
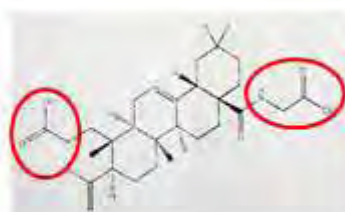
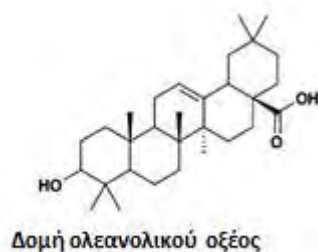
Δομή παραγώγου #45 ολεανολικού οξέος

Εικόνα 22: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #34, #36, #40 και #45 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Επιπροσθέτως, για τα παράγωγα #34, #36, #40 και #45 του ολεανολικού οξέος η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εκτιμήθηκε σε ποσοστά 13,9%, 15,6%, 0,2% και 3,7% αντίστοιχα, τιμές που δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Συμπερασματικά, οι συγκεκριμένες δομικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στα παραπάνω παράγωγα δεν καταλήγουν στην ενίσχυση της δραστηριότητας της.



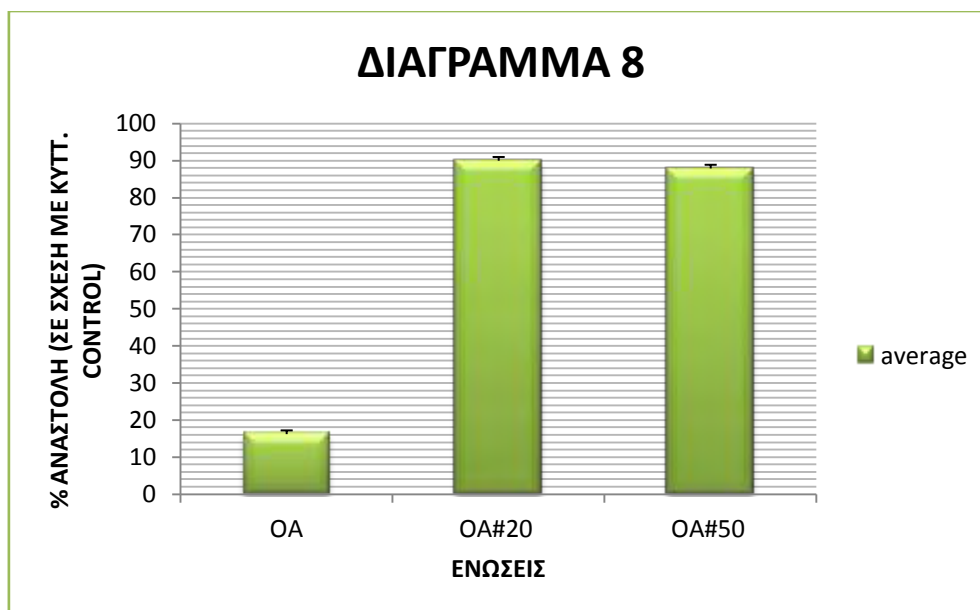
Διάγραμμα 7: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυτάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.



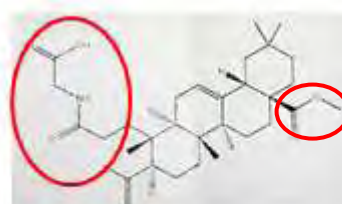
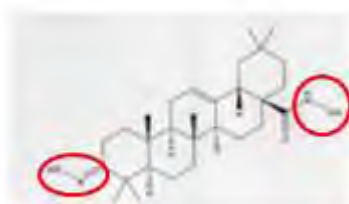
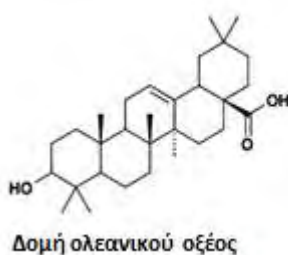
Εικόνα 23: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #46, #48 και #51 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Τέλος, τα τρία ημισυνθετικά παράγωγα #46, #48 και #51 προκάλεσαν μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, με τιμές μη στατιστικά σημαντικές (ποσοστά αναστολής 17,2%, 2,6% και 4,5% αντίστοιχα).

Από τα παράγωγα του ολεανολικού οξέος που εξετάστηκαν μόνο δύο υπέδειξαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στη κυτταρική σειρά HepG2, συγκριτικά με την αρχική ένωση.



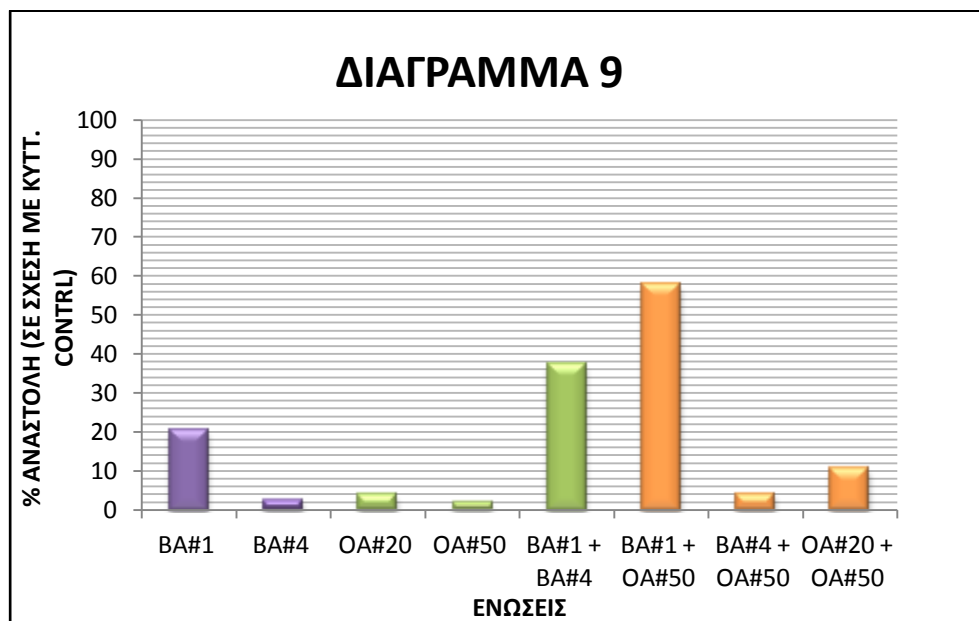
Διάγραμμα 8: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 από διαφορετικά παράγωγα ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25 μ M.



Εικόνα 24: Δομικές τροποποιήσεις των παραγώγων #20 και #50 του ολεανολικού οξέος σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Σύμφωνα με το **διάγραμμα 8** παρατηρούμε ότι η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εκτιμήθηκε σε ποσοστά 89,9% και 87,8% αντίστοιχα, τιμές που ήταν στατιστικά σημαντικές. Είναι εμφανές ότι οι χημικές τροποποιήσεις, οδηγούν σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των ημισυνθετικών ενώσεων σε σύγκριση με το αρχικό μόριο.

Με βάση το γεγονός ότι στην συγκέντρωση των 25 μM οι ενώσεις #1 και #4 του βετουλινικού οξέος καθώς και οι #20 και #50 του ολεανολικού οξέος εμφάνισαν δραστικότητα και ανέστειλαν σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, κατέστη απαραίτητο να εξεταστούν σε μικρότερη συγκέντρωση της τάξης των 10 μM . Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα για να ελεγχθεί η ύπαρξη της πιθανούς συνεργιστικής δράσης των παραπάνω παραγώγων.



Διάγραμμα 9: Επί τοις % αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 συναρτήσεως των πιο δραστικών παραγώγων βετουλινικού και ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 10 μM .

Ενώ τα μεμονωμένα παράγωγα προκάλεσαν μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, με τιμές 20,6% και 2,5% για τα παράγωγα #1 και #4 του βετουλινικού οξέος και 3,8% και 1,8% αντίστοιχα για τα παράγωγα #20 και #50 του ολεανολικού οξέος, ο συνδυασμός των παραπάνω οδήγησε σε ένα διαφορετικό αποτέλεσμα από το αναμενόμενο. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός του παραγώγου #1 και #4 παρουσίασε μία ικανοποιητική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης με τιμή 37,3%. Ιδιαίτερος φάνηκε ο συνδυασμός του παραγώγου #1 και #50, ο οποίος οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 σε ποσοστό 57,7%. Τέλος, ο συνδυασμός των ενώσεων #4 και #50 καθώς και ο #20 και #50 προκάλεσαν αντίστοιχα μικρή και μη στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστά 4,2% και 10,6% αντίστοιχα.

Γενικότερα, τα ημισυνθετικά παράγωγα ενώσεων που εξετάζονται ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα, δοκιμάζονται επειδή σε μια πλειονότητα περιπτώσεων οι φυσικές ενώσεις παρουσιάζουν ασθενή δραστικότητα ως προς την αντικαρκινική δράση και χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος. Τροποποιώντας όμως τη χημική δομή ενός μορίου, συντελείται παρέμβαση στη στοιχειώδη σχέση δομής-λειτουργίας. Έτσι, η

λειτουργία της εκάστοτε ένωσης τροποποιείται επίσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία περισσότερο ή λιγότερο δραστικών ενώσεων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ταυτοποιήθηκαν τέσσερα ημισυνθετικά παράγωγα, τα οποία καταδεικνύουν ισχυρή αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα HepG2. Στο παράγωγο #1 του βετουλινικού οξέος έχει τροποποιηθεί η πλευρική ομάδα του δακτυλίου A. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε την προσθήκη μιας οξίμης αυξάνοντας έτσι τη δραστικότητα της ένωσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ομάδα του υδροξυλίου και το άζωτο της οξίμης μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων σε πρωτεΐνες-στόχους άλλων μορίων ή και με το ενεργό κέντρο του ενζύμου στο οποίο προσδένονται. Το παράγωγο #4 του βετουλινικού οξέος ενώ φέρει κι εκείνο προσθήκη μιας αμινομάδας στον δακτύλιο A, ωστόσο διαφέρει με το παράγωγο #1 ως προς την υδροξυλομάδα. Στην προκειμένη περίπτωση η πλευρική ομάδα που έχει προστεθεί είναι εκείνη της μεθυλομάδας. Η προσθήκη αυτή ενδεχομένως να μην μπορεί να σχηματίσει μία σταθερή σύνδεση εν αντιθέσει με την υδροξυλομάδα ή να προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση, αφού αυξάνει το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα δύο αυτά μόρια επιφέρουν παρόμοια ποσοστά δράσης παρά την διαφορετική πλευρική αλυσίδα στη θέση A ενώ φαίνεται ότι η προσθήκη λίγο μεγαλύτερης πλευρικής αλυσίδας να μην προκαλεί στερεοδιατακτική παρεμπόδιση.

Τα πιο δραστικά παράγωγα #20 και #50 του ολεανολικού οξέος φέρουν διαφορετικές χημικές τροποποιήσεις ως προς τις πλευρικές του ομάδες. Συγκεκριμένα, στο παράγωγο #20 βλέπουμε την προσθήκη μιας οξίμης, η οποία είναι ικανή να σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου αλλά και ο δακτύλιος E έχει τροποποιηθεί με την προσθήκη μιας αμινομάδας. Εν αντιθέσει, το παράγωγο #50 παρουσιάζει μία εντελώς διαφορετική στερεοδιάταξη. Ο δακτύλιος A είναι ανοιγμένος και στον άνθρακα 1 έχει προστεθεί μία πλευρική αλυσίδα βασισμένη στο υδροξαμικό και ο δακτύλιος E φέρει μία πλευρική μεθυλομάδα. Με βάση τη μεγάλη διαφορά στη στερεοδιάταξη των δύο αυτών μορίων, είναι πιθανό ότι τα παράγωγα αυτά επιφέρουν το ανασταλτικό αποτέλεσμα μέσω διαφορετικών μηχανισμών, γεγονός που βασίζεται σε μία απλή θεωρία αφού δε πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα που να μελετούν το μοριακό μηχανισμό δράσης των κυττάρων.

Συνεχίζοντας, ιδιαίτερα αξιοσημείωτα φάνηκαν και τα αποτελέσματα της συνεργιστικής δράσης των πιο δραστικών παραγώγων που μελετήθηκαν στη συγκέντρωση των 10 μM . Αναλυτικά, λοιπόν, ο συνδυασμός του παραγώγου #1 και #4 παρουσίασε μία ικανοποιητική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Το ποσοστό αυτό δείχνει πως μάλλον τα δύο παράγωγα συμβάλλουν σε ένα αποτέλεσμα με προσθετική δράση συμμετέχοντας στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι αφού το

ποσοστό αναστολής είναι υπερδιπλάσιο από αυτό που αναμένονταν από το άθροισμα των δύο ανεξάρτητων μηχανισμών αναστολής. Αξιοσημείωτος φάνηκε ο συνδυασμός του παραγώγου #1 και #50, ο οποίος οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 ενώ με τις ίδιες ενώσεις μόνες τους ήταν πολύ χαμηλότερη. Πιθανότατα τα μόρια έχουν κοινό μηχανισμό δράσης ή επιδρούν στην ίδια κυτταρική διαδικασία για να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Ο συλλογισμός βασίζεται στο γεγονός ότι η μικτή αναστολή του 57,7% είναι παρόμοια με αυτή που έδειξαν μόνα τους αυτά τα μόρια στη συγκέντρωση των 25 μM (βλ. παραπάνω). Επομένως, η τιμή της αναστολής στην ελάχιστη χαμηλότερη συγκέντρωση των 20 μM (αθροιστικά) ταιριάζει με την υπόθεση ότι ίσως στην παρούσα περίπτωση, το κύτταρο αναγνωρίζει μία κοινή συγκέντρωση παραγώγου βετουλινικού και ολεανολικού οξέος. Το αποτέλεσμα, όμως, κρίνεται περίεργο, με βάση τη μεγάλη διαφορά στις πλευρικές αλυσίδες των δύο αυτών παραγώγων. Ο τρίτος συνδυασμός αφορούσε το παράγωγο #4 και #50, όπου ταυτοποιήθηκε ένα χαμηλό ποσοστό ενίσχυσης της δραστηριότητας συμπεραίνοντας, μάλλον, ότι η ήπια προσθετική δράση οφείλεται στην ύπαρξη δύο ανεξάρτητων μηχανισμών. Τέλος, η συνύπαρξη των παραγώγων #20 και #50 προκάλεσε εξίσου μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 που υποδεικνύει ότι ίσως ο ένας μηχανισμός αναστέλλει την επίδραση του άλλου.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι το βετουλινικό οξύ ήταν αρκετά αποτελεσματικό στην πρόκληση κυτταροτοξικότητας στις ηπατοκαρκινικές κυτταρικές σειρές HUH6, HepT1 και HepT3 (τιμές IC₅₀ 4,7 μg/ml, 6,95 μg/ml, και 2,19 μg/ml αντίστοιχα) αλλά όχι σε κύτταρα HepG2 (23.91 μg/ml) (Eichenmüller *et al.*, 2009). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής (Διάγραμμα 1-3). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι το ολεανολικό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις 2-8 μmol/L έχει τη δυνατότητα να προκαλεί ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αύξηση της δραστηριότητας των κασπασών 3 και 8 στις κυτταρικές σειρές HepG2, Hep3B, Huh7 και HA22T (Sheng-lei Yan *et al.*, 2010). Στην παρούσα διπλωματική εργασία το ολεανολικό οξύ μελετήθηκε μόνο στη συγκέντρωση των 25 μM στη κυτταρική σειρά HepG2, συνεπώς δε μπορούμε να οδηγηθούμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα. Τέλος, υπάρχουν έρευνες που αναφέρονται στο ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στην απόπτωση, που ενεργοποιείται υπό αυξημένες συνθήκες στρες. Ευρήματα έχουν δείξει ότι το βετουλινικό οξύ αλλά και τα παράγωγά του ενεργοποιούν τον NF-κB με έναν κυτταρο-ειδικό τρόπο (Fulda, 2008). Ακόμη, τόσο το ολεανικό οξύ όσο και τα διάφορα παράγωγά του στοχεύουν πιθανότατα στο NF-κB, με έναν μηχανισμό που δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη (Laszczyk, 2009). Με τα παραπάνω στοιχεία, μπορούμε ίσως να συμπεράνουμε πως ο συνδυασμός των παραγώγων του βετουλινικού και του ολεανικού οξέος δρα στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο

ενεργοποιείται και υπερ-εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, στοχεύοντας είτε στο ίδιο μόριο είτε στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός ερευνών που πιστοποιούν την συμβολή μιας από τις μεγαλύτερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών του φυτικού βασιλείου, των τριτερπενοειδών, στην άμυνα εναντίον του καρκίνου. Εκτός από τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, τα τριτερπενοειδή έχουν αναδειχθεί ως σημαντικά αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά μόρια. Για τους λόγους αυτούς τα τριτερπενοειδή μελετώνται σε ένα μεγάλο εύρος προ-κλινικών και κλινικών εφαρμογών/δοκιμών στο πλαίσιο χρησιμοποίησής τους ως εν δυνάμει φαρμακευτικές ουσίες.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκαν 32 ημισυνθετικά παράγωγα των τριτερπενοειδών βετουλινικό και ολεανικό οξύ στην ανθρώπινη ηπατική. Απώτερος στόχος ήταν η διερεύνηση των δομικών τροποποιήσεων που αυξάνουν την δραστικότητα των παραγώγων σε σχέση με τις μητρικές ενώσεις. Η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη των ημισυνθετικών ενώσεων, εκτός από τέσσερις περιπτώσεις. Αυτές αφορούν δύο παράγωγα του βετουλινικού και δύο παράγωγα του ολεανολικού οξέος, σε τελική συγκέντρωση 25 μM . Επιπλέον, ελέγχθηκε και η ενδεχόμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε χαμηλότερη συγκέντρωση των πιο δραστικών παραγώγων, δηλαδή σε συγκέντρωση της τάξης των 10 μM , αλλά και σε συνδυασμό των συγκεκριμένων ενώσεων. Τα συγκεκριμένα παράγωγα υπέδειξαν μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 ενώ ο συνδυασμός ενός παραγώγου του βετουλινικού οξέος και ενός ολεανικού οξέος οδήγησε σε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Η διασάφηση των μοριακών μηχανισμών που υπαγορεύουν τη δράση των υπό εξέταση τριτερπενοειδών της παρούσας εργασίας, κρίνεται απαραίτητη για την πλήρη κατανόηση της αντικαρκινικής δράσης των συγκεκριμένων μορίων εναντίον των κυττάρων HepG2. Τέλος, η μελέτη και άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών θα συμβάλει στην αποκρυπτογράφηση ενός ευρέος δικτύου αντικαρκινικής δραστηριότητας των υπό εξέταση τριτερπενίων, αποκαλύπτοντας δράσεις εναντίον διαφόρων τύπων ανθρώπινου καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282:615-7.
- Brown T.A.. *Genomes*. 2010
- Bull, H.A., Brickell, P.M., and Dowd, P.M. (1994). Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 351, 41–44.
- C. W. Chang, T. S. Wu, Y. S. Hsieh, S. C. Kuo and P. D. L. Chao, "Terpenoids of *Syzygium formosanum*," *Journal of Natural Products*, Vol. 62, No. 2, 1999, pp. 327-328. doi:10.1021/np980313w
- Cairns, J. Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature (Lond.)*, 255: 197-200, 1975.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:647–656.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11, 1921–1929.
- Diaz-Cano S.J. General morphological and biological features of neoplasms: Integration of molecular findings. *Histopathology*. 2008;53:1–19.
- E. Pisha, H. Chai, I. S. Lee, T. E. Chagwedera, N. R. Farnsworth, A. C. Cordell, C. W. W. Beecher, H. H. H. Fong, A. D. Kinghorn, D. M. Brown, M. C. Wani, M. E. Wall, T. J. Hieken, T. K. Das Gupta and J. M. Pezzuto, "Discovery of Betulinic Acid as a Selective Inhibitor of Human Melanoma That Functions by Induction of Apoptosis," *Nature Medicine*, Vol. 1, No. 10, 1995, pp. 1046- 1051. doi:10.1038/nm1095-1046
- Eichenmüller M, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells. *Int J Oncol* 2009; 35: 873-879
- Eiznhamer DA, Xu ZQ. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs* 2004; 7:359–373.
- Farber, E., and Cameron, R. The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.*, 35: 125-226, 1980.
- Folkman, J. (1997). Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 181–204.
- Foulds, L. *Neoplastic Development*. Vols. 1 and 2. London: Academic Press, Inc., 1969 and 1975.

- Fukushima, E.O., Seki, H., Ohyama, K., Ono, E., Umemoto, N., Mizutani, M., Saito, K., Muranaka, T., 2011. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 52, 2050–2061.
- Fulda, S. et al. (1998) Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* 273, 33942–33948
- Gallo Margareth B.C. & Sarachine J. Miranda. Biological activities of lupeol, 2009. Global Science Books.
- Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, Atienzar FA. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.* 2012 Apr;28(2):69-87. doi: 10.1007/s10565-011-9208-4
- Gerets HHJ, Hanon E, Cornet M, Dhalluin S, Depelchin O, Canning M, Atienzar FA. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: a preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicol In Vitro.* 2009;23:319-32.
- H. C. Lin, H. Y. Ding and Y. C. Wu, "Two Novel Compounds from *Paeonia suffruticosa*," *Journal of Natural Products*, Vol. 61, No. 3, 1998, pp. 343-346. doi:10.1021/np9704258
- Hanahan D, Weinberger RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000, Copyright 2000 by Cell Press.
- Hanahan D, Weinberger RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100 (1): 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144:646–674.
- Harris, C.C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17, 1187–1198.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* 62, 1180–1190.
- J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. 2013; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>.
- James J. Harding, Ghassan K. Abou-Alfa. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma, 2013. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.06.
- Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA and Elliott BE : Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: Induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment, 1984, *J Cell Physiol*, 3: 87-97.
- Klaassen, C.D., Reisman, S.A., 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 57 - 65.

- Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. *Science* 1980;209:497-9.
- Laszczyk, M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.* 75, 1549-1560.
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49, 57-68.
- Simonsen, J.L., Ross, W.C.J., 1957. The terpenes: The Triterpenes and Their Derivatives, Vol. 5: Hydroxy acids, Hydroxy lactones, Hydroxyaldehyde Acids, Hydroxyketo Acids and the Stereochemistry of the Triterpenes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Liu, J., Chen, X.F., Xia, L., Geng, X.Z. and Li, Z.S. (1087) Effect of oleanolic acid on serum glyceride cholesterol and β -lipo-proteins in normal and experimental hyperlipidemia rats. *Chinese Pharmacological Bulletin* 4, 14-15.
- Liu, J., Wu, Q., Lu, Y.-F., Pi, J., 2008. New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: key roles of metallothionein and Nrf2 induction. *Biochem. Pharmacol.* 76, 922-928.
- López-Terrada, Dolores; Cheung, Sau Wai; Finegold, Milton J.; Knowles, Barbara B. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology*40.10(Oct 2009): 1512-1515.
- M. C. Recio, R. M. Giner, S. Manez, J. Gueho, H. R. Julien, K. Hostettmann and J. L. Rios, "Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*," *Planta Medica*, Vol. 61, No. 1, 1995, pp. 9-12. doi:10.1055/s-2006-957988
- M. Higa, K. Ogihara and S. Yogi, "Bioactive Naphtho- quinone Derivatives from *Diospyros Maritime Blume*," *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 46, No. 8, 1998, pp. 1189-1193. doi:10.1248/cpb.46.1189
- M. M. O'Connell, M. D. Bently, C. S. Campbell and B. J. W. Cole, "Betulin and Lupeol in Bark from Four White- Barked Birches," *Phytochemistry*, Vol. 27, No. 7, 1988, pp. 2175-2176. doi:10.1016/0031-9422(88)80120-1
- M. Waheed Roomi, Ph.D., Neha Shanker, Ph.D., Aleksandra Niedzwiecki, Ph.D. and Matthias Rath, M.D. Dr. Rath Research Institute, CA, USA. Vitamin C in Health: Scientific focus on its anti-cancer efficacy. 2015; *Journal of Cellular Medicine and Natural Health JOURNAL* M. W. Roomi
- M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 11,127-152 (2005). A comprehensive and highly recommended review of tetrazolium-based assays. Figure 2 was adapted from the article.
- Mansour Ghaffari Moghaddam et al., 2012: Biological Activity of Betulinic Acid: A Review, *Pharmacology & Pharmacy*, 3:119-123
- Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Marielly Reis Resende, Thaísia Andrielle da Silva, Juliana Yoshida Públio, Luiz Silva Souza, Carlos Tadeu dos Santos Dias, Nelma de Mello Silva Oliveira and João Evangelista Fiorini. 1999. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. bark in the micronucleus assay. PMCID: PMC4094613

- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16:2794–2804.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85:817–827.
- N.J. Marshall, C.J. Goodwin, and S.J. Holt. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5:69-84 (1999).
- Nowel, P. C. The donai evolution of tumor cell populations. *Science (Wash. DC)*, 794:23-28,1976.
- Paull, K. D. et al. (1988) *J. Heterocycl. Chem.* 25, 911–914.
- Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U., 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 20, 880-892.
- Petrovic N, Schacke W, Gahagan JR, O'Connor CA, Winnicka B, Conway RE, et al. CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* 2007; 110:142–150.
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I. S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.
- Pitot, H. C. Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Med.*, 30:25-39,1979.
- R. H. Cichewicz and S. A. Kouzi, "Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection," *Medicinal Research Reviews*, Vol. 24, No. 1, 2004, pp. 90-114. doi:10.1002/med.10053
- S. G. Jagadeesh, G. L. D. Krupadanam, G. Srimanna- rayana, S. S. Murthy, A. Kaur and S. S. Raja, "Tobacco Caterpillar Antifeedant from the Gotti Stem Wood Triter- pene Betulinic Acid," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, No. 7, 1998, pp. 2797-2799. doi:10.1021/jf970768b
- Salvador J. Diaz-Cano. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable Application of Molecular Marker Design. 2012; PMC3292002
- Scudiero, P. A. et al. (1988) *Cancer Res.* 48, 4827–4833.,
- Sheng-lei Yan, Chun-yin Huang , Shwu-tzy Wu, Mei-chin Yin. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, 2010. doi:10.1016/j.tiv.2009.12.008
- Simone Fulda et al., 2009: Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers, *Drug discovery*, Vol.14
- Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377–1381.

- Steven I. Hajdu. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. 2010; DOI: 10.1002/cncr.25553
- Szakiel, A., Ruskowski, D., Janiszowska, W., 2005. Saponins in *Calendula officinalis* L.- structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochem. Rev.* 4,151-158.
- T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. E. Kilkuskie, L. M. Cosentino, L. M. Ballas, J. B. Jiang, W. P. Janzen, I. S. Chen and K. H. Lee, "Anti-AIDS Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzygium Claviflorum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids," *Journal of Natural Products*, Vol. 57, No. 2, 1994, pp. 243-247. doi:10.1021/np50104a008
- T. Galgon, D. Hoke and B. Drager, "Identification and Quantification of Betulinic Acid," *Phytochemical Analysis*, Vol. 10, No. 4, 1999, pp. 187-190. doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199907/08)10:4<187::AID-PCA443>3.0.CO;2-K
- Thurnher, D.; Turhani, D.; Pelzmann, M.; Wannemacher, B.; Knerer, B.; Formanek, M.; Wacheck, V.; Selzer, E. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck* 2003, 25, 732-740.
- Tomlinson GE, Douglass EC, Pollock BH, Finegold MJ, Schneider NR. Cytogenetic evaluation of a large series of hepatoblastomas: numerical abnormalities with recurring aberrations involving 1q12-q21. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:177-84.
- Trosko JE and Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, *Toxicol Lett*, 49: 283-295
- Van Waes, C., 2007. Nuclear factor- κ B in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 1076-1082.
- Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 9, 211-220.
- W. N. Setzer, M. C. Setzer, R. B. Bates and B. R. Jackes, "Biologically Active Triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* Bark Extract from Paluma, North Queensland, Australia," *Planta Medica*, Vol. 66, No. 2, 2000, pp. 176- 177. doi:10.1055/s-2000-11129
- W. Schühly, J. Heilmann, I. Callis and O. Sticher, "New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*," *Planta Medica*, Vol. 65, No. 8, 1999, pp. 740- 743. doi:10.1055/s-1999-14054
- Wang, X., Ye, X.-I., Liu, R., Chen, H.-L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.-D., Wang, Z., Li, W.- I., Hai, C.-X., 2010. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem.-Biol. Interact.* 184, 328-337.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- WesterinkWMA, SchoonenWG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2007;21:1592-602.
- World Health Organization. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva:World Health Organization; 2008.

- Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., and Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3088–3092.
- Xu JJ, Diaz D, O' Brien PJ. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact.* 2004;150:115–28.
- Y. Kashiwada, H. K. Wang, T. Nagao, S. Kitanaka, I. Yasuda, T. Fujioka, T. Yamagishi, L. M, Cosentino, M. Kozuka, H. Okabe, Y. Ikeshiro, C. Q. Hu, E. Yeh and K. H. Lee, "Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids," *Journal of Natural Products*, Vol. 61, No. 9, pp. 1090-1095. doi:10.1021/np9800710
- Yokota Jun. Tumor progression and metastasis.; *Carcinogenesis* (2000) 21 (3): 497-503.
- Z. Zhang, H. N. Elsohly, M. R. Jacob, D. S. Pasco, L. A. Walker and A. M. Clark, "Natural Products Inhibiting *Candida albicans* Secreted Aspartic Proteases from *To- vomita krukovii*," *Planta Medica*, Vol. 68, No. 1, 2002, pp. 49-54. doi:10.1055/s-2002-20049
- Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **2002**, 175, 17-25.