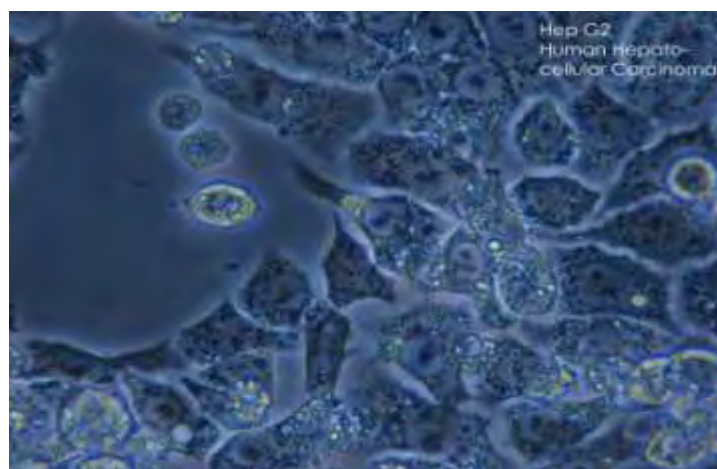




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Μελέτη της επίδρασης τριτερπενοειδών ενώσεων στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων»



Υφαντής Άγγελος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λιαδάκη Καλλιόπη

Λάρισα 2016



«Μελέτη της επίδρασης τριτερπενοειδών ενώσεων στην ανάπτυξη
ηπατικών καρκινικών κυττάρων»

«Effect of triterpenoid compounds in the growth of liver cancer cells»

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή :

Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

Καρπούζας Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κα Λιαδάκη Καλλιόπη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εντρυφήσω και να ασχοληθώ με έναν από τους πιο ενδιαφέροντες ερευνητικούς κλάδους που αφορά τις καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, αντικείμενο το οποίο άπτεται των μελλοντικών επαγγελματικών μου βλέψεων. Επίσης την ευχαριστώ τόσο για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε τόσο κατά τη διάρκεια των τεσσάρων αυτών ακαδημαϊκών χρόνων, όσο και κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την πολύτιμη ψυχολογική και ηθική υποστήριξη. Ιδιαίτερα επίσης θέλω να ευχαριστήσω την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, τον κύριο Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την παροχή των τριπερπενοειδών ενώσεων καθώς και για την αμέριστη αρωγή τους στην προσπάθεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ παράλληλα όλα τα μέλη που στελεχώνουν το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την φιλότιμη προσπάθεια που επέδειξαν σχετικά με τον εγκλιματισμό και την εξοικείωσή μου με το χώρο εργασίας, αλλά και τις παραινέσεις και την ενθάρρυνση τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαραγκού Αικατερίνη για τον ζήλο, την προθυμία και την προσπάθεια της, στην κατανόηση των βασικών κανόνων που διέπουν τη λειτουργία του εργαστηρίου κυτταροκαλλιιεργειών και τις γνώσεις που προσέφερε στα πρώτα βήματά μου στο αντικείμενο της καλλιέργειας καρκινικών κυττάρων. Ευχαριστώ επίσης την προπτυχιακή φοιτήτρια Τζιόρτζιου Μαρία για την ψυχολογική και ηθική στήριξη που κατέβαλλε στην προσπάθεια διεκπεραίωσης της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια του δύσκολου αλλά ταυτόχρονα δημιουργικού ακαδημαϊκού αγώνα τα τέσσερα τελευταία χρόνια των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Ευχαριστώ επίσης όλους τους φίλους μου για τις σημαντικές συμβουλές και την υποστήριξή τους.

Τέλος σε αυτή την παράγραφο θα ήθελα να αφιερώσω λίγα λόγια για την οικογένεια μου, που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας και θα ήθελα εκ βάθους καρδιάς να τους ευχαριστήσω για την ηθική, ψυχολογική και οικονομική συμπαράστασή τους καθώς και για την ενθάρρυνση που επέδειξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Συγκεκριμένα, θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω την μητέρα μου, Μαραγκοπούλου Θεανώ, έπειτα τα αδέρφια μου, Κυριάκο και Μαρία Γκινίδη καθώς και τη γιαγιά μου, Μαραγκοπούλου Σμαράγδα, ανθρώπους οι οποίοι δημιούργησαν τόσο με την αισιοδοξία, την συνεχή προσπάθεια και το θετικό τους πνεύμα, όσο και με τη στοργή, την αφοσίωση και την αστείρευτη αγάπη τους, το σθεναρό υπόβαθρο για την επικοινωνητική πανεπιστημιακή μου πορεία.

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	<u>Σελ.</u>
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	9
<u>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	10
Ενότητα 1.Καρκινογένεση	10
1.1 <u>Καρκίνος: μια γενική θεώρηση</u>	10
1.2 <u>Χαρακτηριστικά-επίκτητες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων</u>	11
1.3 <u>Θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης</u>	15
1.4 <u>Ηπατοκαρκινογένεση</u>	16
1.5 <u>Η κυτταρική σειρά HepG2</u>	18
Ενότητα 2.Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικών οργανισμών	19
2.1 <u>Δευτερογενείς μεταβολίτες</u>	19
2.2 <u>Βιοσύνθεση τερπενοειδών</u>	21
2.3 <u>Βιολογικές δράσεις των τριτερπενοειδών α-αμυρίνη και β-αμυρίνη</u>	22
2.4 <u>Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος</u>	24
2.5 <u>Βιολογικές δράσεις ουρσολικού οξέος</u>	26
2.6 <u>Βιολογικές δράσεις λουπεόλης</u>	26
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
<u>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	29
1. <u>Χημικές δομές των φυσικών και ημισυνθετικών τριτερπενοειδών ενώσεων (Πίνακας 1)</u>	29
2. <u>Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά καλλιέργειας κυττάρων</u>	30
3. <u>Μεθοδολογίες και πειραματικά πρωτόκολλα</u>	32
3.1 <u>Συντήρηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων HepG2</u>	32
3.2 <u>Ψύξη κυττάρων</u>	33
3.3 <u>Απόψυξη κυττάρων</u>	33
3.4 <u>Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο</u>	34
3.5 <u>Ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης με τη βιοδοκιμή ΧΤΤ</u>	36
3.5.1 <u>Αρχή της μεθόδου</u>	36
3.5.2 <u>Πειραματική διαδικασία</u>	37
3.6 <u>Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων</u>	38
3.7 <u>Έλεγχος Μυκοπλάσματος σε κύτταρα HepG2</u>	39

<u>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	41
<u>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	44
<u>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	45

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	<u>Σελ.</u>
----------------------------	--------------------

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	6
---------------------	---

Εικόνα 1: Επίκτητες ιδιότητες καρκινικών κυττάρων.....11

Εικόνα 2: Τα στάδια της αγγειογένεσης κατά την ογκογένεση.....14

Εικόνα 3: Η αλληλουχία της ανάπτυξης του ανθρώπινου HCC και οι γονιδιακές αλλαγές-τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στο ανθρώπινο ήπαρ.....17

Εικόνα 4: Χημική δομή ισοπεντανίου.....19

Εικόνα 5: Χημική δομή ισοπρενίου.....20

Εικόνα 6: Απλοποιημένο σχήμα των κυριότερων οδών βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η αλληλοσυσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό.....20

Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα εξειδικευμένης απεικόνισης της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών.....22

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της τελικής σύστασης του πλήρους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κυττάρων.....31

Εικόνα 9: Αιμοκυτταρόμετρο (πλακίδιο Neubauer).....34

Εικόνα 10: Δομή αιμοκυτταρόμετρου.....35

Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας ενός αιμοκυτταρόμετρου και ενδεικτική εστίαση σε ένα από τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα.....35

Εικόνα 12: Μεταβολισμός του ΧΤΤ στην υδατοδιαλυτή χρωστική φορμαζάνη από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες.....36

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	<u>Σελ.</u>
----------------------------	--------------------

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	6
---------------------	---

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Χημικές δομές των φυσικών και ημισυνθετικών τριτερπενοειδών ενώσεων.....29-30

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Σελ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

7

Γράφημα: % Αναστολή ανάπτυξης κυττάρων HepG2 συναρτήσει φυσικών και ημισυνθετικών τριτερπενοειδών σε τελική συγκέντρωση 25 μ M.....41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπενοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών σε όλο το φυτικό βασίλειο. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν αναδείξει τα τριτερπενοειδή ως μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ενώσεων. Επιπλέον, μελέτες των τελευταίων ετών αποδεικνύουν την αντικαρκινική δραστηριότητα διαφόρων τριτερπενοειδών σε ποικίλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου ηπατικού καρκίνου. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αντικαρκινική δράση πέντε σημαντικών καθαρών τριτερπενοειδών ενώσεων (α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, βετουλινικό οξύ, ουρσολικό οξύ και λουπεόλη) και συγκεκριμένων ημισυνθετικών παραγώγων της κάθε ένωσης. Συνολικά μελετήθηκαν 15 ενώσεις. Χρησιμοποιώντας την χρωματομετρική βιοδοκιμή ΧΤΤ έγινε 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 φυσικών και των ημισυνθετικών ενώσεων, εκτός από μία περίπτωση. Αυτή αφορά ένα παράγωγο του βετουλινικού οξέος, στο οποίο έχει αφαιρεθεί μια συγκεκριμένη ομάδα υδροξυλίου, η οποία προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των ηπατικών κυττάρων HepG2, με τιμή IC₅₀ της τάξεως του 25 μM. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για τη διασάφηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη δράση της ένωσης αυτής στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

ABSTRACT

Triterpenoids consist one of the most essential categories of secondary metabolites in the plant kingdom. Previous studies have demonstrated that triterpenoids exhibit important antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties. In addition, recent studies exhibit the anticancer activity of various triterpenes against a variety of cancer cell lines, including human hepatocellular carcinoma. In the present study the anticancer activity of five purified triterpenoids (α -amyirin, β -amyirin, betulinic acid, ursolic acid and lupeol), as well as their specific semi-synthetic derivatives was examined. A total of 15 compounds were tested. The quantification of HepG2 survival was evaluated upon treatment with the various triterpenes for 24 hrs, using the XTT colorimetric bioassay. HepG2 growth was not affected upon treatment with the various triterpenes, with the exception of one compound. This was a derivative of betulinic acid, which lacks an hydroxyl group, and was found to exhibit significant inhibition of HepG2 growth, with the IC₅₀ value of 25 μ M. Further studies are needed to clarify the molecular mechanisms involved in the action of this compound.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενότητα 1. Καρκινογένεση

1.1. Καρκίνος: μια γενική θεώρηση

Η μακροχρόνια έρευνα στο πεδίο του καρκίνου έχει δημιουργήσει ένα πλούσιο και πολύπλοκο σκελετό γνώσης, που αποκαλύπτουν ότι ο καρκίνος είναι μία ασθένεια η οποία περιλαμβάνει δυναμικές αλλαγές στο γονιδίωμα. Τα θεμέλια τέθηκαν όταν ανακαλύφθηκαν μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας σε ογκογονίδια και μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Και τα δύο είδη μεταλλάξεων στις παραπάνω κατηγορίες γονιδίων ανιχνεύθηκαν μέσω της τροποποίησης αυτών των γονιδίων σε ανθρώπινα και ζωικά καρκινικά κύτταρα καθώς και μέσω της παρατήρησης φαινοτύπων σχετιζόμενων με τον καρκίνο σε πειραματικά μοντέλα (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

Κάποιοι ισχυρίζονται ότι η έρευνα για την προέλευση και τη θεραπεία του καρκίνου θα συνεχίζεται στο μέλλον, γεγονός που θα οδηγήσει στην προσθήκη νέων επιπέδων πολυπλοκότητας στην επιστημονική βιβλιογραφία. Ήδη προβλέπεται ότι η έρευνα σχετικά με τον καρκίνο αναπτύσσεται σε μια λογική επιστήμη, όπου το μεγάλο φάσμα πολυπλοκότητας της ασθένειας αυτής, θα γίνει κατανοητό στα πλαίσια ενός μικρού αριθμού συγκεκριμένων αρχών-κανόνων. Οι κανόνες αυτοί αφορούν το μετασχηματισμό φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε κακοήθεις καρκίνους. Η έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποκαλύψει ένα μικρό αριθμό μοριακών, βιοχημικών, και κυτταρικών «αναγνωριστικών σημαδιών» ή αλλιώς επίκτητων χαρακτηριστικών-ιδιοτήτων που φέρουν οι περισσότεροι και πιθανώς όλοι οι τύποι των ανθρώπινων καρκίνων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από τα διδάγματα της κυτταρικής βιολογίας ότι όλα τα κύτταρα των θηλαστικών διαθέτουν ένα παρόμοιο μοριακό κύκλωμα το οποίο ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το θάνατό τους. Αντίστοιχα στα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται ελαττώματα σε ρυθμιστικά κυκλώματα που ελέγχουν το φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ομοιόσταση (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι η καρκινογένεση στους ανθρώπους είναι μια πολυσταδιακή διεργασία και όλα αυτά τα στάδια αντικατοπτρίζουν γενετικές αλλαγές που οδηγούν στον προοδευτικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε κύτταρα με υψηλού επιπέδου κακοήθεια. Επιπλέον, παθολογικές αναλύσεις διαφορετικών οργάνων αποκαλύπτουν αλλοιώσεις οι οποίες φαίνεται να αντιπροσωπεύουν τα ενδιάμεσα στάδια σε μια διαδικασία μέσα από την οποία τα κύτταρα εξελίσσονται από μια φυσιολογική κατάσταση διαμέσου μιας σειράς προ-κακοήθων καταστάσεων σε διεισδυτικούς-μεταστατικούς καρκίνους. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διακριτοί τύποι καρκίνων και υπότυποι όγκων που απαντώνται σε συγκεκριμένα όργανα (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

Αυτές οι παρατηρήσεις αποκτούν ισχυρότερη βάση λόγω εκτεταμένων ερευνητικών δεδομένων τα οποία υποδεικνύουν ότι τα γονιδιώματα των καρκινικών κυττάρων τροποποιούνται με μη αναστρέψιμο τρόπο σε πολλαπλές περιοχές λόγω αλλοιώσεων που επάγονται τόσο από σημειακές μεταλλάξεις όσο και από χρωμοσωμικές αλλαγές. Διαγονιδιακά μοντέλα καρκινογένεσης έχουν επαναλαμβανόμενα υποστηρίξει το συμπέρασμα ότι η καρκινογένεση σε ποντίκια περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια (πολυσταδιακό φαινόμενο). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται ότι η ανάπτυξη ενός όγκου πραγματοποιείται μέσω μιας διαδικασίας που προσομοιάζει την Δαρβινική εξελικτική θεωρία, δηλαδή μια διαδοχή γενετικών αλλαγών, όπου η καθεμιά προσδίδει κάποιου είδους αναπτυξιακό πλεονέκτημα και οδηγεί σε προοδευτική μεταστροφή των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

1.2. Χαρακτηριστικά-επίκτητες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων

Η επιστημονική κοινότητα υποστηρίζει ότι υπάρχουν έξι θεμελιώδεις αλλαγές στην κυτταρική φυσιολογία, οι οποίες συνολικά καθορίζουν τον κακοήγη καρκινικό μετασχηματισμό. Αυτές περιλαμβάνουν την αυτάρκεια αναπτυξιακών σημάτων, την αδυναμία ανταπόκρισης σε ανασταλτικά αναπτυξιακά σήματα, την αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), το απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής-αυτοδιπλασιασμού, τη διατήρηση της αγγειογένεσης και την εισβολή-διείσδυση και μετάσταση του όγκου. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί στους περισσότερους και ίσως σε όλους τους τύπους ανθρώπινων όγκων. Αξίζει να τονιστεί ότι η πολλαπλότητα των κυτταρικών αμυντικών συστημάτων ίσως εξηγεί γιατί ο καρκίνος είναι σχετικά σπάνιος κατά τη διάρκεια μιας μέσης ανθρώπινης ζωής (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).



Εικόνα 1: Επίκτητες ιδιότητες καρκινικών κυττάρων (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*)

Στη συνέχεια αναλύονται οι επίκτητες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων:

α) Αυτάρκεια των αναπτυξιακών σημάτων. Αρχικά τα φυσιολογικά κύτταρα απαιτούν μιτογόνα αναπτυξιακά σήματα (growth signals, GS) για την μετάβαση από ένα στάδιο ηρεμίας σε ένα ενεργό στάδιο πολλαπλασιασμού. Αυτά τα σήματα μεταβιβάζονται μέσα στο κύτταρο από διαμεμβρανικούς υποδοχείς που προσδένουν συγκεκριμένες τάξεις σηματοδοτικών μορίων όπως αυξητικούς παράγοντες, συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και μόρια που σχετίζονται με την πρόσφυση/αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων. Με βάση τις σημερινές γνώσεις κανένα είδος φυσιολογικού κυττάρου δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί απουσία τέτοιου είδους διεγερτικών σημάτων ανάπτυξης. Άρα η εξάρτηση από τη σηματοδότηση που είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη είναι προφανής κατά τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε καλλιέργεια, όπου τυπικά πολλαπλασιάζονται με την προσθήκη των απαραίτητων παραγόντων. Αυτού του είδους η «συμπεριφορά» έρχεται σε αντίθεση με αυτήν των καρκινικών κυττάρων, τα οποία δείχνουν μια σημαντικά μειωμένη εξάρτηση από εξωκυτταρικά αναπτυξιακά σήματα, καθώς μπορούν τα ίδια να παράξουν τα απαραίτητα αναπτυξιακά σήματα. Η επίκτητη αυτάρκεια σε σήματα διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν από τις πρώτα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που διασαφηνίστηκαν, κυρίως λόγω επικρατών ογκογονιδίων που βρέθηκε να ρυθμίζουν την εν λόγω ικανότητα. Οι τρεις κύριες μοριακές στρατηγικές για την επίτευξη αυτής της επίκτητης ικανότητας αφορούν αλλαγές στα εξωκυττάρια σήματα διέγερσης της ανάπτυξης είτε μέσω τροποποίησης διακυτταρικών μεταγωγέων αυτών των σημάτων, είτε μέσω τροποποιήσεων στα ενδοκυτταρικά κυκλώματα που μεταφράζουν αυτά τα σήματα στην εκάστοτε κυτταρική απόκριση. Αξίζει να υπογραμμιστεί το γεγονός ότι ορισμένα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα βιοσύνθεσης αυξητικών παραγόντων στους οποίους ανταποκρίνονται μέσω υποδοχέων που φέρουν στην κυτταρική τους επιφάνεια. Έτσι δημιουργείται ένας σηματοδοτικός βρόχος θετικής ανατροφοδότησης λόγω αυτοκρινούς διέγερσης του πολλαπλασιασμού (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

β) Αδυναμία ανταπόκρισης σε ανασταλτικά αναπτυξιακά σήματα. Σε ένα φυσιολογικό ιστό, πολλαπλά σήματα αναστολής της ανάπτυξης λειτουργούν για να διατηρήσουν την κυτταρική «ηρεμία». Αυτά τα σήματα περιλαμβάνουν διαλυτούς αναστολείς της ανάπτυξης και ακινητοποιημένους αναστολείς στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων. 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 ξαναεισέλθουν στον κύκλο παρουσία των σωστών εξωκυττάρια σημάτων. 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 η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (RB) στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή καταστέλλει τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου προσδένοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες E_2F οι οποίοι συμμετέχουν στη μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G_1 στη φάση S. Σε διάφορους τύπους ανθρώπινων καρκίνων το κύκλωμα της πρωτεΐνης RB διαταράσσεται με αποτέλεσμα την αποδέσμευση των παραγόντων E_2F από την πρωτεΐνη RB,

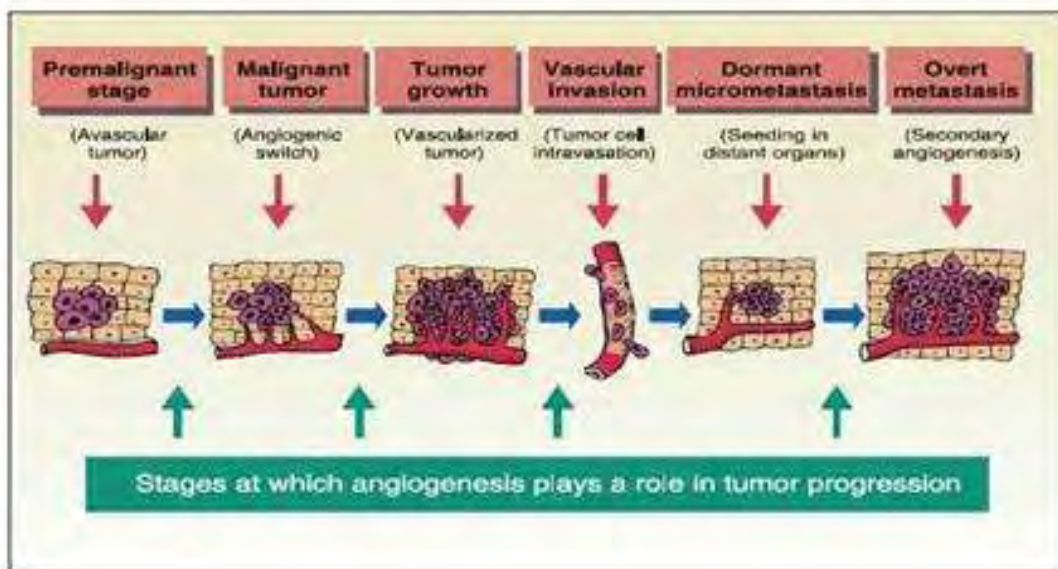
γεγονός που οδηγεί στην ανεξέλεγκτη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (άρση αναστολής μετάβασης από τη φάση G₁ στη φάση S). Το προαναφερθέν αποτελεί ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα μοριακών στρατηγικών που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα ώστε να μην αποκρίνονται στα ανασταλτικά σήματα που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

γ) Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επεκτείνονται σε αριθμό επηρεάζεται όχι μόνο από το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά και από το ρυθμό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Πειραματικά δεδομένα που αφορούν στην υπερ-έκφραση του γονιδίου bcl-2 σε λεμφώματα επιβεβαιώνουν την πιθανότητα ότι η απόπτωση λειτουργεί σαν ένα φράγμα στην ανάπτυξη καρκίνου. Επίσης η ταυτόχρονη έκφραση του ογκογονιδίου myc με το bcl-2 σε διαγονιδιακά ποντίκια, έδειξε ότι το δεύτερο ήταν ικανό να προωθήσει το σχηματισμό λεμφωμάτων Β-λεμφοκυττάρων ενισχύοντας την επιβίωση των κυττάρων αυτών. Συμπερασματικά η τροποποίηση συστατικών της αποπτωτικής μηχανής μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη δυναμική της ανάπτυξης ενός όγκου, παρέχοντας έτσι μία αιτιολογία για την απενεργοποίηση αυτής της μηχανής κατά την ογκογένεση (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

δ) Απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής/αυτοδιπλασιασμού. Η έρευνα που έχει διεξαχθεί τα τελευταία τριάντα χρόνια υποδηλώνει ότι η επίκτητη διαταραχή της διακυτταρικής σηματοδότησης από μόνη της δεν μπορεί να διασφαλίσει την ανάπτυξη ενός όγκου. Τα κύτταρα των θηλαστικών φέρουν ένα εγγενές, κυτταρικά αυτόνομο πρόγραμμα που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό τους. Αυτό το πρόγραμμα φαίνεται ότι λειτουργεί ανεξάρτητα από τα μονοπάτια διακυτταρικής σηματοδότησης και διαταράσσεται κατά την επέκταση των καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια έχουν περιορισμένο δυναμικό αντιγραφής και μετά από ένα συγκεκριμένο αριθμό διπλασιασμών σταματούν να μεγαλώνουν, μια διαδικασία που ονομάζεται γήρανση. Έχει δειχθεί ότι η απορρύθμιση ρυθμιστικών στοιχείων του κυτταρικού κύκλου όπως είναι η απενεργοποίηση των πρωτεϊνών RB και p53 σε ανθρώπινους ινοβλάστες, επιτρέπει τη συνέχεια του πολλαπλασιασμού τους για επιπλέον γενεές μέχρι 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. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ένα μέτρο της γήρανσης των κυττάρων είναι η βράχυνση των τελομερών. Τα τελομερή αποτελούνται από μια μικρή αλληλουχία μήκους 6 bp στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια 50-100 bp τελομερικού DNA σηματοδοτεί τη μέτρηση μιας γενιάς σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Η προοδευτική απώλεια των τελομερών μέσω διαδοχικών κύκλων αντιγραφής οδηγεί στην αδυναμία τους να προστατεύσουν τα άκρα του χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα τον θάνατο του κυττάρου. Σε όλους τους τύπους κακοήθων κυττάρων η τελομεράση υπερεκφράζεται σε ποσοστό 85-90%, γεγονός που επιτρέπει τον απεριόριστο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Άρα η τελομεράση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθανατοποίηση των καρκινικών κυττάρων (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

ε) Διατήρηση της αγγειογένεσης. Το οξυγόνο και τα θρεπτικά που παρέχονται από τις αγγειώσεις των διαφόρων οργάνων είναι ζωτικά για την κυτταρική λειτουργία και επιβίωση. Όταν δημιουργηθεί ένας ιστός συντελείται και η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων

(αγγειογένεση) η οποία αποτελεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη και ταυτόχρονα μεταβατική διαδικασία. Έτσι και η ανάπτυξη των νεοπλασιών απαιτεί και την ικανότητα αγγειογένεσης. Η ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών σημάτων μπορεί να προωθήσει ή να αναστείλλει την αγγειογένεση. Μία τάξη τέτοιων σημάτων περιλαμβάνει διαλυτούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, με τους τελευταίους να εντοπίζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης οι ιντεγκρίνες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση κυτάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων φαίνεται ότι διαδραματίζουν μείζονα ρόλο. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα σημάτων επαγωγής της αγγειογένεσης αποτελούν ο παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και οι παράγοντες FGF1/2 (Fibroblast Growth Factors). Αντίθετα μία χαρακτηριστική περίπτωση αναστολέα της αγγειογένεσης είναι η θρομβοσπονδίνη-1. Ο καταλυτικός ρόλος της αγγειογένεσης υποστηρίζεται περαιτέρω από την ικανότητα μιας μεγάλης πληθώρας αντι-αγγειογενετικών ουσιών να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη κυττάρων όγκων μετά από τη χορήγησή τους σε ποντίκια. (D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000). Τα βασικά στάδια της αγγειογένεσης κατά τη διάρκεια της καρκινογενετικής διαδικασίας φαίνονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Τα στάδια της αγγειογένεσης κατά την ογκογένεση (Pang & Poon, 2006).

Σύμφωνα με την εικόνα 2 απαιτείται μία αλλαγή-μετάβαση σε φαινότυπο σχετιζόμενο με την αγγειογένεση (angiogenic switch) ως προαπαιτούμενο για την μετάβαση από ένα προκακοήθες στάδιο σε ένα διεισδυτικό καρκίνο. Η νεοαγγειογένεση (διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων) παρέχει όχι μόνο θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη όγκου, αλλά και μια μεγάλη επιφάνεια αγγείων με μη ολοκληρωμένη βασική μεμβράνη γεγονός που διευκολύνει την ενδοαγγειακή διείσδυση των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα που εμφυτεύονται σε απομακρυσμένα όργανα αρχικά αναπτύσσουν μη αγγειωμένες αδρανείς μικρο-μεταστάσεις. Πάλι το φαινόμενο «angiogenic switch» οδηγεί σε δευτερογενή

αγγειογένεση και περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου προκαλώντας επιπλέον μεταστάσεις (*Pang and Poon, 2006*).

ζ) Εισβολή/διείσδυση και μετάσταση του όγκου. Η ικανότητα για εισβολή και μετάσταση επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να μετακινηθούν από την πρωτογενή κυτταρική μάζα-όγκο και να εγκαθιδρύνουν νέες αποικίες σε διαφορετικές περιοχές στο σώμα (μεταστάσεις). 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 εισβολή και η μετάσταση είναι υπερβολικά πολύπλοκες διαδικασίες, και οι γενετικοί και βιοχημικοί καθοριστές παραμένουν ατελώς κατανοητοί. Σε μηχανιστικό επίπεδο είναι στενά συνδεδεμένες διαδικασίες, γεγονός που δικαιολογεί τον αλληλοσυσχετισμό τους ως μια γενική ικανότητα-ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων. Και οι δύο αυτές διαδικασίες αξιοποιούν παρόμοιες λειτουργικές στρατηγικές, που περιλαμβάνουν αλλαγές στη φυσική σύζευξη των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον τους καθώς και την ενεργοποίηση εξωκυτταρικών πρωτεασών (*D.Hanahan and R.A.Weinberg, 2000*).

1.3. Θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης

Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει την ανάπτυξη διάφορων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση (*Potter VR, 1984, Fika V, 1986*), την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού (*Loewenstein WR, 1979*) ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ'επαφής, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα (*Kanno Y, 1985*) και την ικανότητα να διηθεί και να μεθίσταται (*Nicolson GL, 1987*). Η καρκινική μάζα είναι μονοκλωνικής προέλευσης, αλλά, ο κλωνικός πολλαπλασιασμός κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής καρκινογενετικής διαδικασίας, προκαλεί την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών φαινοτύπων μέσα στον όγκο, πιθανότατα μέσω επιπλέον γενετικών ή επιγενετικών αλλοιώσεων (*Kerbel RS et al., 1984*). Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.

α) Έναρξη (initiation): Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το στάδιο έναρξης της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι η πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα αργέγονο κύτταρο (stem cell) (*Potter VR, 1981*). Η επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα προκαλεί μετάλλαξη, πιθανότατα σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να οδηγηθεί σε τελική διαφοροποίηση (*Miller DR et al., 1987*), δίνοντας γένεση σε ένα κύτταρο που έχει την ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ένα κύτταρο, που κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο από τον φυσιολογικό αριθμό μιτώσεων (*Trosko JE et al., 1989*).

β) Προαγωγή (promotion): Ο βασικός μηχανισμός που διέπει το δεύτερο στάδιο της προαγωγής της καρκινογενετικής διαδικασίας είναι ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των αρχικά μεταλλαγμένων (initiated) κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων που προάγουν την μίτωση (προαγωγείς) (*Trosko JE et al., 1983*). Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απομάκρυνση του μιτογόνου παράγοντα. Καθώς το μεταλλαγμένο κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται, μετά το πέρας της κυτταρικής διαίρεσης που κανονικά θα πέθαινε (π.χ. την 40η) στις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις προστίθενται γενωμικές βλάβες στα κύτταρα-απογόνους οι οποίες κανονικά δεν θα εμφανίζονταν καθώς τα κύτταρα θα πέθαιναν στην 40η διαίρεση. Οι γενωμικές

βλάβες είναι ραγδαίες καθώς η γενωμική αστάθεια μετά την κρίσιμη 40η διαίρεση αυξάνεται σημαντικά. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο.

γ) Προόδος (progression): Στο τρίτο στάδιο της προόδου το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα (μιτογόνο παράγοντα) κύτταρο, μετατρέπεται σε καρκινικό, ανεξάρτητο από τον προαγωγέα, κύτταρο. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή μιτογόνο επίδραση του προαγωγέα, κάποιο κύτταρο εμφανίζει επιπλέον γενετικές μεταλλάξεις που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο (*Hennings H et al., 1983*). Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν ότι στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες, κάποιες από τις οποίες αφορούν την απαλοιφή αντιογκογονιδίων (*Koufos A et al., 1985, Marx J, 1989*). Συχνά οι φάσεις της προαγωγής και της προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση, γεγονός που ίσως είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα.

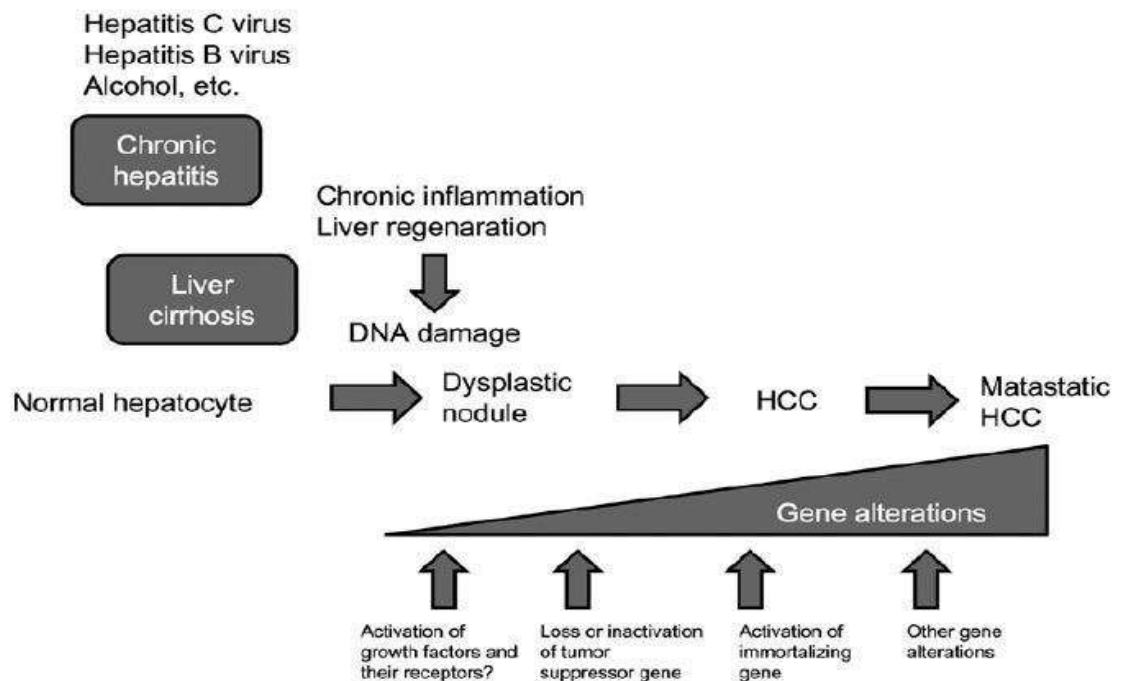
1.4. Ηπατοκαρκινογένεση

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma, HCC) είναι η πιο κοινή μορφή κύριου ηπατικού καρκινώματος και αποτελεί ένα πιεστικό κοινωνικοιατρικό πρόβλημα σε αρκετές χώρες, ειδικά στην Ασία και στην υποσαχάρια Αφρική. Παγκοσμίως, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ο πέμπτος πιο κοινός καρκίνος και η τρίτη σε σειρά αιτία των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο. Έχει ανεπαρκή πρόγνωση με τον αριθμό των θανάτων να είναι περίπου ισοδύναμος με τον αριθμό των περιστατικών που διαγιγνώσκονται ετησίως (περίπου 600.000). Το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης είναι κάτω από το 9%. Στις Ηνωμένες Πολιτείες αυξάνεται η εμφάνιση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου και τα τελευταία 25 χρόνια έχει καταγραφεί μία αύξηση της τάξης του 70%. Η Αμερικανική Εταιρεία του Καρκίνου (American Cancer Society) αναφέρει ότι το 2010 συνέβησαν περισσότερα από 24.000 νέα περιστατικά και σχεδόν 19.000 θάνατοι στις Ηνωμένες Πολιτείες εξαιτίας του ηπατικού καρκίνου.

Οι βασικοί παράγοντες κινδύνου για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι αρκετά γνωστοί και εξαρτώνται από τη γεωγραφική περιοχή. Στην Ευρώπη, τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ιαπωνία, οι κύριοι παράγοντες κινδύνου είναι: α) η κίρρωση του ήπατος, β) η λοίμωξη από ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), γ) το αλκοόλ, και δ) ο καπνός. Αντιθέτως στην Αφρική και στην Ασία οι αιτιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την λοίμωξη από HBV και HCV, τη χρήση καπνού και την έκθεση σε αφλατοξίνη.

Η αντιμετώπιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος έχει συμβατικά χωριστεί σε α) θεραπευτική και β) καταπραϋντική. 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. Το Sofarenilb είναι το μόνο φάρμακο που έχει εγκριθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες για τη θεραπεία προχωρημένου HCC. Ωστόσο αυτό το φάρμακο έχει υψηλό κόστος (\$5.400 ανά μήνα θεραπείας), και παρουσιάζει σοβαρές παρενέργειες, με κυριότερο τον υψηλό κίνδυνο αιμορραγίας (R.J Thorpill et al., 2011).



Εικόνα 3: Η αλληλουχία της ανάπτυξης του ανθρώπινου HCC και οι γονιδιακές αλλαγές-τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στο ανθρώπινο ήπαρ (H Shiraha et al., 2013)

Στην εικόνα 3 φαίνεται ότι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται λόγω χρόνιας φλεγμονής λόγω ιογενούς ηπατίτιδας ή ηπατικής βλάβης λόγω της κατανάλωσης αλκοόλ. Η ηπατοκαρκινογένεση πιθανώς ξεκινάει σε δυσπλαστικά εξογκώματα που αποτελούνται από προ-νεοπλαστικά ηπατοκύτταρα και η περαιτέρω συσσώρευση γονιδιακών αλλαγών είναι υπεύθυνη για τον κακοήγη μετασχηματισμό τους. Όπως και στην περίπτωση άλλων τύπων ανθρώπινων καρκίνων, η ηπατοκαρκινογένεση φαίνεται ότι είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία κατά την οποία τροποποιείται η έκφραση πολλών διαφορετικών γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Αυτές οι γενετικές αλλαγές σχετίζονται με ογκοκατασταλτικά γονίδια, ογκογονίδια, ενεργοποίηση αναπτυξιακών μονοπατιών και μονοπατιών σχετιζόμενων με αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους. Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης είναι στενά συνδεδεμένη με την αθανατοποίηση στο HCC.

Οι μηχανισμοί της προαγωγικής φάσης της καρκινογένεσης στο ήπαρ περιλαμβάνουν:

α) Κλωνικό πολλαπλασιασμό των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων, μέσω αύξησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού ή ελάττωσης του ρυθμού κυτταρικού θανάτου (Moolgavkar SH,

1983). Και με τους δύο αυτούς μηχανισμούς αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης επιπλέον γενετικών βλαβών, που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκινικού φαινοτύπου.

β) Μεταβολές στις διόδους κυτταρικής επικοινωνίας (Gap junction). Ο πολλαπλασιασμός των ηπατοκυττάρων ρυθμίζεται από την άμεση επικοινωνία των κυττάρων μεταξύ τους μέσω των διόδων επικοινωνίας, που επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων και μορίων χαμηλού μοριακού βάρους. Γενικά, τα καρκινικά κύτταρα, εμφανίζουν μείωση της κυτταρικής επικοινωνίας και έτσι απελευθερώνονται από τα ανασταλτικά μηνύματα πολλαπλασιασμού των γειτονικών κυττάρων (Yamasaki H, 1988).

γ) Σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορεί να δράσουν κατά το προαγωγικό στάδιο της ηπατοκαρκινογένεσης. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες γενικά ελαττώνουν τον σχηματισμό νεοπλασματικών και προνεοπλασματικών βλαβών στο ήπαρ, εάν δοθούν στο προαγωγικό στάδιο της ηπατοκαρκινογένεσης. Από την άλλη, ένας μεγάλος αριθμός προαγωγέων φαίνεται ότι αυξάνει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και επάγει τη λιπιδική υπεροξειδωση στο ήπαρ πειραματόζων.

1.5. Η κυτταρική σειρά HepG2

Η HepG2 είναι μία ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά. Είναι συνεχής κυτταρική σειρά και προέρχεται από ιστό ήπατος ενός δεκαπεντάχρονου Καυκάσιου Αμερικανού με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα είναι επιθηλιακά στη μορφολογία τους, έχουν πρότυπο χρωμοσωμικό αριθμό 55 και μεγαλώνουν σε μονοστιβάδες και συσσωματώματα. Εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, α₂-μικροσφαιρίνη και πλασμινογόνο. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε ερέθισμα με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη. Εξαιτίας τόσο της μορφολογικής όσο και της λειτουργικής τους ποικιλομορφίας *in vitro*, αποτελούν ένα χρήσιμο σύστημα μοντέλο για τη μελέτη των ηπατοκυττάρων και κατά συνέπεια ασθενειών που σχετίζονται με το ήπαρ. Τέλος χρησιμοποιούνται σε μελέτες μεταβολισμού του ήπατος και της τοξικότητας των ξеноβιοτικών καθώς και σε μελέτες κατανόησης της ηπατοκαρκινογένεσης.

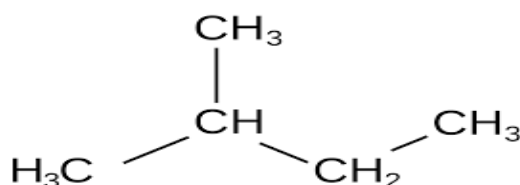
Ενότητα 2. Δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτικών οργανισμών

2.1. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Στους φυσικούς οικοτόπους τα φυτά περιβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό δυνητικών εχθρών. Σχεδόν σε όλα τα οικοσυστήματα υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία βακτηρίων, ιών, μυκήτων, νηματώδων, ακαρέων, εντόμων, θηλαστικών και άλλων φυτοφάγων ζώων. Από τη φύση τους τα φυτά δεν μπορούν να αποφύγουν τα φυτοφάγα ζώα και τους παθογόνους οργανισμούς και πρέπει να προστατευθούν με άλλους τρόπους. Ο κύριος τρόπος προστασίας αφορά στην παραγωγή μιας ομάδας οργανικών φυτικών ενώσεων που καλούνται δευτερογενείς μεταβολίτες. Εκτός από την προστασία των φυτών, μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες, για παράδειγμα στη δομική στήριξη, όπως η λιγνίνη, ή λειτουργούν ως χρωστικές, όπως οι ανθοκυανίνες (Taiz & Zaiger 2010).

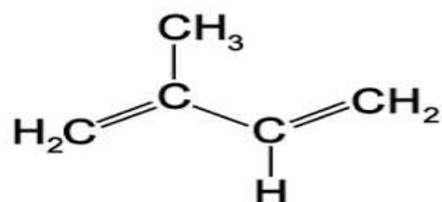
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά δεν φαίνονται να έχουν άμεσο ρόλο στην αύξηση και στην ανάπτυξή τους. Έτσι, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν έχουν γενικά αναγνωρίσιμους άμεσους ρόλους στις διεργασίες της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής, της μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, της διακίνησης, της σύνθεσης πρωτεϊνών, της αφομοίωσης θρεπτικών ή της διαφοροποίησης ή του σχηματισμού πρωτογενών μεταβολιτών, όπως υδατανθράκων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων. Επίσης αξίζει να τονιστεί ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τους πρωτογενείς μεταβολίτες λόγω της περιορισμένης κατανομής τους στο φυτικό βασίλειο. Ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες απαντώνται σε όλο το φυτικό βασίλειο, ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες βρίσκονται μόνο σε ένα φυτικό είδος ή σε ομάδα συγγενικών ειδών (Taiz & Zaiger 2010).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαιρούνται σε τρεις, χημικά διακριτές ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ουσίες και τις αζωτούχες ενώσεις. Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Οι περισσότερες από τις διαφορετικές ενώσεις της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτες στο νερό. Βιοσυντίθενται από το ακέτυλο-συνένζυμο-A (ακέτυλο-CoA) ή ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης μέσω των οδών του μεβαλονικού οξέος και μέσω της οδού της φωσφορικής μεθυλερυθριόλης (οδός της MEP). Όλα τα τερπένια προέρχονται από τη συνένωση συστατικών με πέντε άτομα άνθρακα (ονομάζονται επίσης C₅ μονάδες) που έχουν τον διακλαδισμένο σκελετό ισοπεντανίου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Χημική δομή ισοπεντανίου (Taiz & Zaiger, 2010)

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 (Εικόνα 5). Για το λόγο αυτό τα τερπένια ονομάζονται και ισοπρενοειδή.

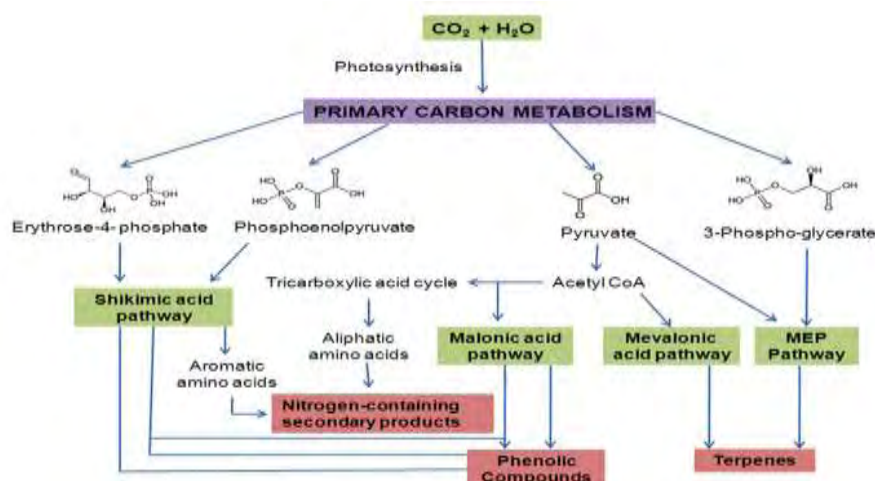


Εικόνα 5: Χημική δομή ισοπρενίου (Taiz & Zaiger, 2010)

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 φαινόλες είναι αρωματικά συστατικά που σχηματίζονται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος ή του μονοπατιού του μηλονικού οξέος με διάφορους τρόπους. Οι αζωτούχες ενώσεις συντίθεται πρωτογενώς από αμινοξέα. 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 (Taiz & Zaiger 2010).

Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται οι κυριότερες οδοί βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η αλληλοσυσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό.



Για πολλά χρόνια η

Εικόνα 6: Απλοποιημένο σχήμα των κυριότερων οδών βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών και η αλληλοσυσχέτισή τους με τον πρωτογενή μεταβολισμό (Taiz & Zaiger 2010).

προσαρμοστική

κή ανοσία των περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών δεν ήταν γνωστή. Επικρατούσε η άποψη ότι αυτές οι ενώσεις ήταν απλώς μη λειτουργικά τελικά προϊόντα μεταβολισμού ή άχρηστα μεταβολικά παραπροϊόντα (απόβλητα). Η μελέτη αυτών των ενώσεων άρχισε κατά το δέκατο ένατο και στις αρχές του εικοστού αιώνα από οργανικούς χημικούς, οι οποίοι ενδιαφέρονταν για την σημασία των δευτερογενών μεταβολιτών ως φάρμακα, δηλητήρια, αρωματικές ουσίες και βιομηχανικές πρώτες ύλες (Taiz & Zaiger 2010). Σήμερα είναι γνωστό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες προσδίδουν σημαντικές οικολογικές λειτουργίες: α) προστατεύουν τα φυτά έναντι φυτοφάγων οργανισμών και μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς, β) προσελκύουν (με οσμή, χρώμα, γεύση) επικονιαστές και ζώα που συμβάλλουν στη διασπορά των σπερμάτων, γ) λειτουργούν ως παράγοντες ανταγωνισμού μεταξύ των φυτών και συμβίωσης τους με τους μικροοργανισμούς. Η ικανότητα ανταγωνισμού και επιβίωσης των φυτών επηρεάζεται πολύ από τις οικολογικές λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών που τα ίδια παράγουν (Taiz & Zaiger 2010).

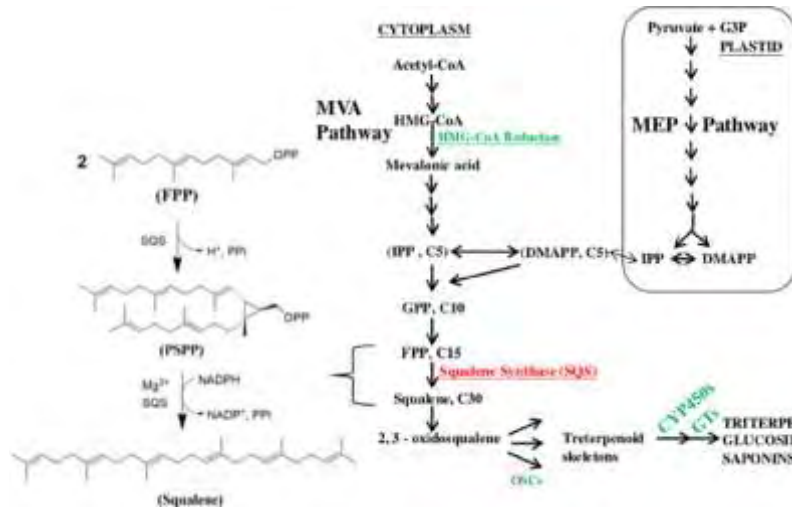
Ο δευτερογενής μεταβολισμός σχετίζεται επίσης και με τη γεωργία. Οι ίδιες αμυντικές ενώσεις που αυξάνουν την αναπαραγωγική αρμοστικότητα (fitness) των φυτών, και τα προφυλάσσουν από μύκητες, βακτήρια και φυτοφάγους οργανισμούς, μπορούν να τα καταστήσουν ακατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου. Πολλά 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 (Taiz & Zaiger 2010).

2.2. Βιοσύνθεση τερπενοειδών

Τα τερπένια συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες με τουλάχιστον δύο διαφορετικούς τρόπους (Εικόνα 7). Με την καλά μελετημένη οδό του μεβαλονικού οξέος, τρία μόρια ακετυλο-

CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ. Στη συνέχεια αυτή η σημαντική ενδιάμεση ένωση έξι ατόμων άνθρακα πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (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 της αναγωγής του άνθρακα μέσω μιας σειράς ξεχωριστών αντιδράσεων που ονομάζεται οδός της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (μονοπάτι MEP) η οποία διεξάγεται στους χλωροπλάστες και στα πλαστίδια. Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και άλλα δύο άτομα άνθρακα που προέρχονται από το πυροσταφυλικό

για να ενδιάμεσο πέντε άτομα φωσφορική 2-C-μέθυλο- (MEP) που τελικά σε IPP (2010).



συμπυκνώνονται σχηματίζουν τον μεταβολίτη με άνθρακα την 5-1-δέοξυ-D-τελευταίος ανασχηματίζεται σε 4-φωσφορική D-ερυθριτόλη μετατρέπεται (Taiz & Zaiger

Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα εξειδικευμένης απεικόνισης της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών (Taiz & Zaiger 2010).

Το IPP και το ισομερές του 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 μια ένωση με 15 άτομα άνθρακα, το διφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP), που αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των σεσκιτερπενίων. Η προσθήκη ενός ακόμη μορίου IPP οδηγεί στο σχηματισμό μιας ένωσης με 20 άτομα άνθρακα, το διφωσφορικό γερανυλογερανύλιο (GGPP), που αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των διτερπενίων. Τελικά τα FPP και GGPP με διμερισμό οδηγούν στο

σχηματισμό τριτερπενίων (C_{30}) και τετρατερπενίων (C_{40}) (Taiz & Zaiger 2010). Αναλυτικότερα, το πρώτο καθοριστικό βήμα στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών περιλαμβάνει την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός αριθμού διαφορετικών πιθανών προϊόντων στα οποία συγκαταλέγονται και τα τριτερπενοειδή (Haralampidis K. et al., 2002). Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι τα σесκιτερπένια και τα τριτερπένια σχηματίζονται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος που λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, 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 (Taiz & Zaiger 2010).

2.3 Βιολογικές δράσεις των τριτερπενοειδών α-αμυρίνη και β-αμυρίνη

Οι ενώσεις α-αμυρίνη και β-αμυρίνη είναι πεντακυκλικά τριτερπενοειδή που συνήθως εντοπίζονται σε φαρμακευτικά φυτά και σε ρητίνες, οι οποίες αποκτώνται από επεξεργασία φλοιών διαφόρων ειδών της οικογένειας *Burseraceae*. Μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν αναδείξει τις βιολογικές δράσεις της α-αμυρίνης και β-αμυρίνης (L.H.Vazquez et al.,2012).

Η α-αμυρίνη είναι ένα τριτερπένιο φυσικής προέλευσης που μπορεί να απομονωθεί από ποικίλες πηγές, κυρίως από ρητίνες. Αξιοσημείωτες ποσότητες α-αμυρίνης έχουν απομονωθεί εκτός από τις ρητίνες διαφόρων ειδών *Bursera* ή *Protium* της οικογένειας *Burseraceae* και από τα φυτά *Cassia obtusifolia* και *Commiphora holtziana*. Οι πιο σημαντικές πηγές β-αμυρίνης περιλαμβάνουν τα φυτά *Nelumbo nucifera*, *Eucalyptus globules*, *Ficus carica*, *Ficus cordata* και *Byrsonima crassa* (L.H.Vazquez et al.,2012).

Οι αμυρίνες (α-αμυρίνη και β-αμυρίνη) ανιχνεύονται σε διάφορα φυτά και φυτικά υλικά όπως φύλλα, φλοιό, ξύλο και στις ρητίνες. Για την απομόνωσή τους, αρχικά το φυτικό υλικό υφίσταται μια προ-επεξεργασία και σε δεύτερη φάση πραγματοποιούνται εκχυλίσσεις σε κατάλληλους οργανικούς διαλύτες όπως δίχλωρομεθάνιο, χλωροφόρμιο, εξάνιο και μεθανόλη. Τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με χρωματογραφικές μεθοδολογίες (κυρίως αέρια χρωματογραφία, χρωματογραφία λεπτής στιβάδος και HPTLC) τόσο για διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των υπό εξέταση ενώσεων (L.H.Vazquez et al.,2012).

Στη συνέχεια αναλύονται οι βιολογικές δράσεις των αμυρινών . Συγκεκριμένα, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες εκχυλισμάτων σε εξάνιο και μεθανόλη του φυτού *Bombax malabaricum* εξετάστηκαν έναντι διαφορετικών στελεχών βακτηρίων, μυκήτων και στελεχών ζύμης. Το εκχύλισμα εξανίου περιείχε στερόλες συμπεριλαμβανομένης και της α-αμυρίνης. Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα εξανίου εμφάνισε μέτριες έως ασθενείς δραστηριότητες έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Candida albicans*. (El-Hagrassi et al., 2011). Σε αντίθεση το εκχύλισμα μεθανόλης ήταν αρκετά αποτελεσματικό έναντι των παραπάνω μικροβίων. Η β-αμυρίνη παρουσιάζει δραστηριότητα εναντίων των μυκήτων και κάποιων μικροβίων. Σε μια πρόσφατη έρευνα εξετάστηκαν *in vitro* οι δραστηριότητες της β-αμυρίνης και άλλων βιοενεργών συστατικών στα φύλλα του φυτού *Siraitia grosvenorii*, έναντι διαφόρων βακτηριακών ειδών και βρέθηκε ότι η β-αμυρίνη προκάλεσε μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των *Streptococcus mutans* και *Fusobacterium nucleatum* (Zheng et al., 2011).

Η αντιφλεγμονώδης δράση των α και β αμυρινών μελετήθηκε σε ποντίκια στα οποία είχε επαχθεί ένα είδος κολίτιδας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναστολή των NF- κ B και του παράγοντα CREB είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου αυτά τα τριτερπένια ασκούν την αντιφλεγμονώδη δράση τους (Vitor *et al.*, 2009). Άλλη έρευνα κατέδειξε ότι η α - και η β -αμυρίνη ρυθμίζει την οξεία περιοδοντική φλεγμονή σε αρουραίους μέσω ελάττωσης της διείσδυσης των ουδετερόφιλων, του οξειδωτικού στρες και της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF- α , και προτείνει ότι αυτά τα τριτερπένια όντως είναι χρήσιμα σαν θεραπευτικά μέσα για τη θεραπεία της ουλίτιδας και για την καθυστέρηση της προόδου της περιοδοντίτιδας (Holanda-Pinto *et al.*, 2008). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η β -αμυρίνη μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην επαγόμενη από κολλαγόνο συγκόλληση των αιμοπεταλίων (με τιμή IC50 της τάξεως του 4,5 μ g/ml), γεγονός που την καθιστά πιο χρήσιμο και πιθανό θεραπευτικό μέσο από την ασπιρίνη η οποία έχει μία τιμή IC50 της τάξεως του 11 μ g/ml (Ching *et al.*, 2010)

Η α - και η β -αμυρίνη έχουν ελεγχθεί για μία ποικιλία βιολογικών λειτουργιών. Η β -αμυρίνη δείχθηκε ότι έχει θεραπευτική δράση έναντι του έλκους σε ποντίκια που είχαν δεχθεί πειραματικό γαστρικό τραυματισμό (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011). Εκτός όμως από τον καταλυτικό ρόλο που παρουσιάζουν οι αμυρίνες σε φαρμακολογικό πλαίσιο, έχουν ανακαλυφθεί και αντικαρκινικές δράσεις αυτών των τριτερπενίων. Σε άλλη έρευνα η β -αμυρίνη δεν εμφάνισε αντικαρκινική δράση έναντι διαφορετικών καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων του αδενοκαρκινώματος τραχήλου (HeLa), αδενοκαρκινώματος στήθους (MCF7) και του επιδερμικού καρκινώματος (A431) (Csapi *et al.*, 2010). Τέλος η β -αμυρίνη που απομονώθηκε από φλοιό του μίσχου του φυτού *Camelia japonica* ασθενή κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών A549 και HL-60 (τιμές IC50 46,2 και 38,6 μ M αντίστοιχα (Thao *et al.*, 2010).

2.4 Βιολογικές δράσεις βετουλινικού οξέος

Το βετουλινικό οξύ είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπενοειδές που καταδεικνύει μια ποικιλία βιολογικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων που περιλαμβάνουν: α) αναστολή του ιού της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV), β) αντιβακτηριδιακή δράση, γ) δράση εναντίον της ελονοσίας, δ) αντιφλεγμονώδη δράση, ε) δράση εναντίον των ελμίνθων και ζ) αντικαρκινική δράση. Το βετουλινικό οξύ είναι ευρέως κατανοημένο σε όλο το φυτικό βασίλειο. Το δέντρο σημύδας (*Betula spp.*, *Betulaceae*) είναι μία από τις πηγές βετουλινικού οξέος από όπου το βετουλινικό οξύ μπορεί να απομονωθεί σε σημαντικές ποσότητες. Το βετουλινικό οξύ μπορεί επίσης να απομονωθεί και από διάφορες πηγές συμπεριλαμβανομένων των *Ziziphus spp.* (*Rhamnaceae*), *Syzygium spp.* (*Myrtaceae*), *Diospyros spp.* (*Ebenaceae*) και *Paeonia spp.* (*Paeoniaceae*) (Mansour Ghaffari Moghaddam *et al.*, 2012).

Η δράση του βετουλινικού οξέος εναντίον του ιού HIV μελετήθηκε σε H9 λεμφοκύτταρα. Αποδείχθηκε ότι το βετουλινικό οξύ εμφανίζει ανασταλτική επίδραση στην αντιγραφή του HIV-1 (τιμή IC50 1,4 μ M), ενώ στην ίδια συγκέντρωση δεν προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης σε μη μολυσμένων H9 λεμφοκυττάρων (τιμή IC50 13 μ M). Αυτό το εύρημα οδήγησε στην ανάπτυξη παραγώγων του βετουλινικού οξέος με σκοπό την αξιολόγηση της δράσης τους εναντίον του HIV (Fujioka *et al.*, 1994).

Το βετουλινικό οξύ παρουσιάζει επίσης αντιβακτηριδιακή δράση. Σε ένα άλλο παράδειγμα, βετουλινικό οξύ που απομονώθηκε από ακατέργαστο εκχύλισμα φλοιού του φυτού *Syncarpia glomulifera* (*Myrtaceae*) βρέθηκε ότι διαθέτει αντιβακτηριδιακή και κυτταροτοξική δράση. Επιπλέον, η ίδια μελέτη έδειξε ότι η σχετικά μεγάλη αφθονία (10% του ακατέργαστου εκχυλίσματος) και ο υψηλός βαθμός δραστηριότητας του βετουλινικού οξέος είναι υπεύθυνα για τη βιοδραστηριότητα του ακατέργαστου εκχυλίσματος φλοιού. Βετουλινικό οξύ που απομονώθηκε από το φυτό *Zizyphus joazeiro* έδειξε σημαντική δραστηριότητα εναντίον Gram(+) βακτηρίων (*Schuhly et al., 1999*). Τέλος, το βετουλινικό οξύ διαθέτει δραστηριότητα εναντίον του μύκητα *Candida albicans*, καθώς δρα ανασταλτικά στην εκκρινόμενη πρωτεάση ασπαρτικού (SAP) με τιμή της τάξεως του IC50 6,5 µg/ml (*Zhang et al., 2002*).

Πολύ σημαντικές είναι οι αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζει το βετουλινικό οξύ καθώς και οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η δράση αυτή. Το βετουλινικό οξύ που απομονώθηκε από εκχύλισμα μεθανόλης του φυτού *Dillenia indica* εμφάνισε σημαντική δράση εναντίον λευχαιμιών σε ανθρώπινες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές U937, HL60 και K562 με τιμές IC50 13,73, 12,84, 15,27 mg/ml αντίστοιχα (*D.Kumar et al., 2010*). Μια άλλη μελέτη έδειξε την ανασταλτική δραστηριότητα του βετουλινικού οξέος στην ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς K562 (τιμή IC50 6,25 µg/ml) και την επαγωγή απόπτωσης σε ποσοστό 35% στη συγκέντρωση των 25 µg/ml (*H.Liu et al., 2004*). Επίσης η *in vitro* αντικαρκινική δράση του βετουλινικού οξέος μελετήθηκε σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και βρέθηκε ότι το βετουλινικό οξύ προκάλεσε σημαντική αναστολή ανάπτυξης σε WI-38 κύτταρα ινοβλαστών και μέτρια αναστολή της ανάπτυξης σε VA-13 κακοήθη καρκινικά κύτταρα και σε HepG2 κύτταρα με αντίστοιχες τιμές IC50 1,3, 11,6 και 21 µM (*L.Fu et al., 2005*).

Πολυάριθμες μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν στοχεύσει στη διασάφηση των μοριακών μηχανισμών της αντικαρκινικής δράσης του βετουλινικού οξέος. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της κυτταροτοξικότητάς του είναι η ικανότητά του να ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Ένας μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του αποπτωτικού μονοπατιού σε καρκινικά κύτταρα είναι με άμεση επίδραση του βετουλινικού οξέος στα μιτοχόνδρια. 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, S. et al., 1998*). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας συνιστά ένα κεντρικό συντονιστικό γεγονός στην επαγόμενη από το βετουλινικό οξύ ενεργοποίηση των κασπασών και του κατακερματισμού του DNA. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο το βετουλινικό οξύ ρυθμίζει την αποπτωτική μηχανή περιλαμβάνει τον έλεγχο της έκφρασης της οικογένειας των πρωτεϊνών Bcl-2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 περιλαμβάνει τόσο αποπτωτικά όσο και αντιαποπτωτικά μέλη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι Bcl-2, Bcl-X_L και Mcl-1 (αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες) και οι Bax, Bak (αποπτωτικές πρωτεΐνες). Η ανισσοροπία στην αναλογία αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μελών μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση ή στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, μεταχείριση με βετουλινικό οξύ οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax σε κύτταρα νευροβλαστώματος, γλοιοβλαστώματος και μελανώματος. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης της αντιαποπτωτικής 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. 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 δράση του βετουλινικού οξέος έχει εκτενώς μελετηθεί σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, κυρίως δείγματα όγκων και πειραματικά μοντέλα ποντικών όπου έχουν δεχθεί ξενομοσχεύματα. Ενώ αρχικές μελέτες έδειχναν ότι το βετουλινικό οξύ είναι επιλεκτικά κυτταροτοξικό εναντίον κυτταρικών σειρών μελανώματος, αποδείχθηκε εν συνεχεία ότι διαθέτει αντικαρκινική δράση εναντίον και άλλων τύπων ανθρώπινων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου νευροβλαστώματος, γλοιοβλαστώματος, λευχαιμίες καθώς και καρκινωμάτων σε λαιμό, στήθος, ήπαρ, πνεύμονα, προστάτη και τράχηλο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί το γεγονός ότι τα φυσιολογικά κύτταρα εμφανίζουν αντοχή στη δράση του βετουλινικού οξέος γεγονός που καταδεικνύει την εξειδίκευση της δράσης αυτής της ένωσης για τα καρκινικά κύτταρα. Τέλος το βετουλινικό οξύ έχει προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης όγκων σε ποικίλα μοντέλα ζώων ανθρώπινου καρκίνου. Ενδεικτικά, η χορήγηση βετουλινικού οξέος σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού που δέχθηκε ξενομόσχευμα από καρκίνο των ωοθηκών οδήγησε σε αύξηση του χρόνου επιβίωσης. Επίσης το βετουλινικό οξύ ανέστειλε την ανάπτυξη όγκου σε ένα ζωικό μοντέλο που δέχθηκε ξενομόσχευμα καρκίνου μελανώματος (*Simone Fulda et al., 2009*).

2.5 Βιολογικές δράσεις ουρσολικού οξέος

Το ουρσολικό οξύ αποτελεί μία από τις πιο αναγνωρισμένες χημειοπροστατευτικές ενώσεις. Διαθέτει αντιφλεγμονώδεις και αντι-υπερλιπιδαιμιδικές ιδιότητες και έχει χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα αισθητικής και άλλα προϊόντα υγείας.

Η έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει αναδείξει τις ανασταλτικές επιδράσεις του ουρσολικού οξέος σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές της ουροδόχου κύστεως, του προστάτη, του παγκρέατος και του εντέρου (*Kassi et al., 2007, Chadalapaka et al., 2008, Xavier et al., 2009, Gao et al., 2007*).

Το ουρσολικό οξύ έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την ικανότητά αναστολής της ανάπτυξης όγκων. Συγκεκριμένα το ουρσολικό οξύ ανέστειλε την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς μελανώματος ποντικού B16, επιδρώντας σε μια πρώιμη φάση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₁ (*ES-S_{AADY} et al., 1996*). Επιπρόσθετα, δείχθηκε ότι το ουρσολικό οξύ είναι ικανό να αναστέλλει την μετάσταση/διείσδυση HT1080 ανθρώπινων κυττάρων ινοσάρκωματος ελαττώνοντας τα επίπεδα έκφρασης της μεταλλοπρωτεάσης 9 (MMP-9: matrix metalloproteinase 9). Επίσης έχει διερευνηθεί η αποπτωτική επίδραση του ουρσολικού οξέος σε ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG2) και βρέθηκε ότι η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HepG2 συντελείται με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση και τον χρόνο επώασης. Στη ίδια μελέτη δείχθηκε ότι 30 μM ουρσολικού οξέος προκαλούν κατακερματισμό του DNA και ενισχύουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (*KIM DK et al., 2000*). Το ουρσολικό οξύ δείχθηκε ότι παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξική δραστηριότητα εναντίον ανθρώπινων κυτταρικών σειρών λευχαιμιών και λεμφωμάτων. Το ουρσολικό οξύ ήταν αποτελεσματικό εναντίον του

λεμφώματος Burkitt (IC50: 2,5 µg/ml) και εναντίον κυττάρων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (IC50: 17,79 µg/ml) (CHIANG LC et al., 2003). Σημαντικό είναι να τονιστεί πως το ουρσολικό οξύ διαθέτει ηπατοπροστατευτική δράση έναντι μεγάλης ποικιλίας χημικά επαγόμενων ηπατικών βλαβών. Συμπερασματικά, οι αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ουρσολικού οξέος οδηγούν σε μελέτες με σκοπό την κλινική εφαρμογή αυτού και των ημισυνθετικών παραγώγων του (Z. Ovesna et al., 2004).

2.6 Βιολογικές δράσεις λουπεόλης

Η λουπεόλη είναι ένα σημαντικό τριτερπενοειδές το οποίο έχει ωφέλιμες επιδράσεις σε μια πληθώρα διαταραχών τόσο ως θεραπευτικός όσο και ως χημειοπροστατευτικός παράγοντας. Τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια έχουν γίνει αξιόλογες προσπάθειες από ερευνητές σε όλο τον κόσμο για να βελτιώσουν αυτή τη ζωτική χημική ένωση προκειμένου να αξιοποιηθεί κλινικά για τη θεραπεία διάφορων διαταραχών (Mohammad Saleem, 2009).

Η λουπεόλη εντοπίζεται σε λαχανικά όπως το άσπρο λάχανο, την πιπεριά, το αγγούρι, την τομάτα καθώς και σε φρούτα όπως το σύκο, το μάνγκο, τη φράουλα, το κόκκινο σταφύλι και σε φαρμακευτικά φυτά όπως τα *Tamarindus indica*, *Allanblackia monticola*, *Himatanthus succuba*, *Celastrus paniculatus* (Mohammad Saleem, 2009).

In vitro και *in vivo* πειράματα έχουν δείξει ότι η λουπεόλη διαθέτει ποικίλες φαρμακολογικές δραστηριότητες. Αυτές περιλαμβάνουν την δραστικότητα εναντίον της φλεγμονής, του καρκίνου, της αρθρίτιδας, του διαβήτη, των καρδιακών ασθενειών, της νεφρικής και της ηπατικής τοξικότητας. Η αντιφλεγμονώδης δράση της λουπεόλης σχετίζεται με την ικανότητά της να ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα και την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων. Συγκεκριμένα η λουπεόλη κατέστειλε τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων και των Τ-λεμφοκυττάρων και την εξαρτώμενη από CD4+ παραγωγή κυτταροκινών σε ένα μοντέλο ποντικού που παρουσίαζε αρθρίτιδα. Η χορήγηση λουπεόλης από το στόμα (12,5-200 mg/kg) προκάλεσε σημαντική μείωση των CD4+ και CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων και των επιπέδων κυτταροκινών (IL-2, IFN-γ και IL-4) σε αρθριτικά ποντίκια. Ένα άλλο παράδειγμα αφορά τη χρήση λουπεόλης για τη θεραπεία της φλεγμονής που προκαλείται από το βρογχικό άσθμα σε πειραματικά μοντέλα ποντικών. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση λουπεόλης προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα των εωσινόφιλων στο βρόγχο-κυψελιδικό υγρό και οδήγησε στη μείωση της βλέννας και της συνολικής φλεγμονής στους πνεύμονες (Vasconcelos JF et al., 2008). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι δίαιτες πλούσιες σε φυτοχημικά μπορεί να μειώσουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Αξιοσημείωτο είναι ότι η λουπεόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση και αναστέλλει την χημικά επαγόμενη καταστροφή του DNA σε *in vitro* συστήματα (Sultana S. et al., 2003). Η τοπική εφαρμογή λουπεόλης (200 µg/ποντίκι) προλαμβάνει τις επαγόμενες από το χημικό παράγοντα DMBA(7,12 διμέθυλοβενζαθρακένιο), θραύσεις στο DNA σε δέρμα τρωκτικών (Nigam N. et al. 2007). Από άλλες μελέτες αποδείχθηκε ότι η λουπεόλη αναστέλλει την προαγωγή του καρκίνου/όγκου σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με καρκίνο δέρματος δευτέρου σταδίου (Saleem M. et al., 2004). Η τοπική εφαρμογή λουπεόλης (40 mg/kg/3 φορές την εβδομάδα) για 28 εβδομάδες μείωσε σημαντικά το βάρος του όγκου, την πολλαπλότητα των όγκων (Saleem M. et al., 2004). Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η λουπεόλη ανέστειλε την

μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA σε πειραματικό μοντέλο ποντικού με καρκίνο στο δέρμα (*Saleem M. et al., 2004*). Επιπλέον δείχθηκε ότι η λουπεόλη αναστέλλει την ανάπτυξη υψηλά μεταστατικών καρκίνων ανθρώπινου μελανώματος, μέσω ρύθμισης της αναλογίας των πρωτεϊνικών επιπέδων Bax και Bcl-2. Είναι σημαντικό ότι χορήγηση λουπεόλης δεν προκάλεσε κυτταροτοξική δράση σε φυσιολογικά ανθρώπινα μελανοκύτταρα (*Saleem M. et al., 2008*).

Η χορήγηση λουπεόλης για μεγάλο χρονικό διάστημα (72 ωρών) έδειξε ότι διαθέτει κυτταροτοξική δράση έναντιδιαφορετικών καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως Τα-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (IC50: 50 μ M), καρκινώματος μαστού MCF-7 (IC50: 50 μ M), καρκινώματος πνεύμονα A-549 (IC50: 50 μ M), πολλαπλού μυελώματος RPMI 8826 (IC50: 50 μ M), καρκινώματος τραχήλου HeLa (IC50: 37 μ M) και μελανώματος G361 (IC50: 50 μ M) (*Cmoch P. et al., 2008*).

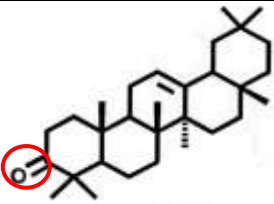
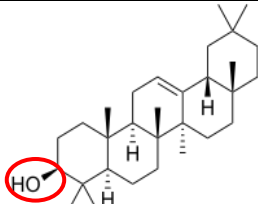
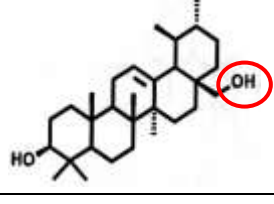
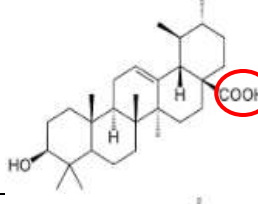
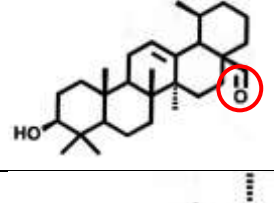
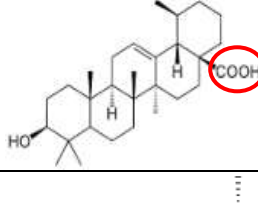
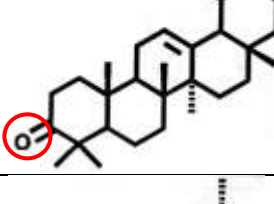
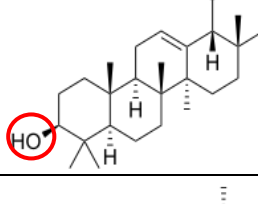
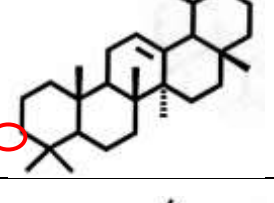
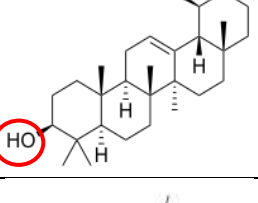
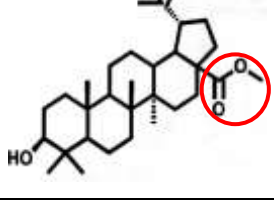
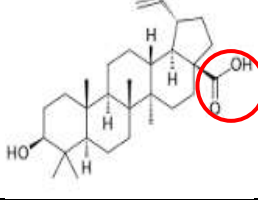
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

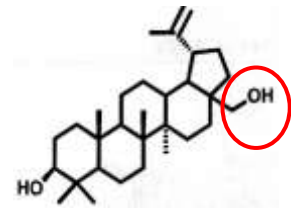
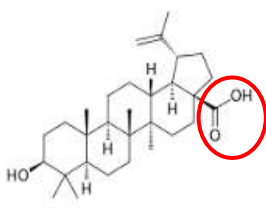
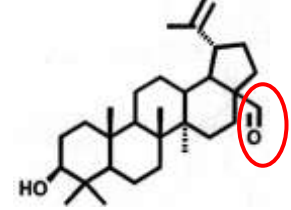
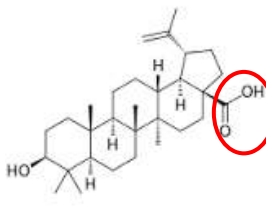
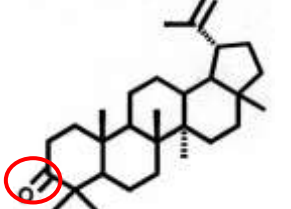
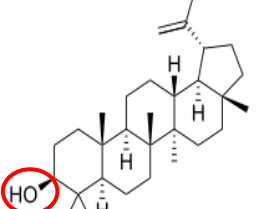
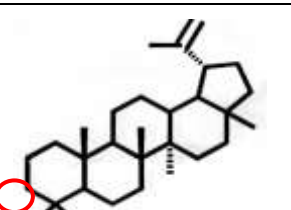
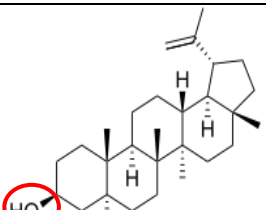
Η παρούσα εργασία εστιάστηκε στη μελέτη της δράσης καθαρών τριτερπενοειδών ουσιών στην ανάπτυξη ανθρωπίνων ηπατικών καρκινικών κυττάρων (HepG2). Μελετήθηκαν συνολικά 15 ενώσεις που περιλαμβάνουν τα τριτερπενοειδή α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, βετουλινικό οξύ, ουρσολικό οξύ και λουπεόλη καθώς και επιλεγμένα ημισυνθετικά παράγωγά τους.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά οι 15 ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Όλες οι ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO.

1.Χημικές δομές των φυσικών και ημισυνθετικών τριτερπενοειδών ενώσεων (Πίνακας 1). Με κόκκινο κύκλο σημειώνονται οι διαφορές των ημισυνθετικών παραγώγων με τις φυσικές ενώσεις.

<u>Ένωση</u>	<u>Χημική δομή ένωσης</u>	<u>MW (g/mol)</u>	<u>Χημική δομή ένωσης</u>	<u>Όνομα φυσικού τριτερπενοειδούς</u>
Παράγωγο β-αμυρίνης		424,7		β-αμυρίνη
Παράγωγο ουρσολικού οξέος#1		442,72		ουρσολικό οξύ
Παράγωγο ουρσολικού οξέος#2		440,7		ουρσολικό οξύ
Παράγωγο α-αμυρίνης#1		424,7		α-αμυρίνη
Παράγωγο α-αμυρίνης#2		410,72		α-αμυρίνη
Παράγωγο βετουλινικού οξέος#1		470,73		βετουλινικό οξύ

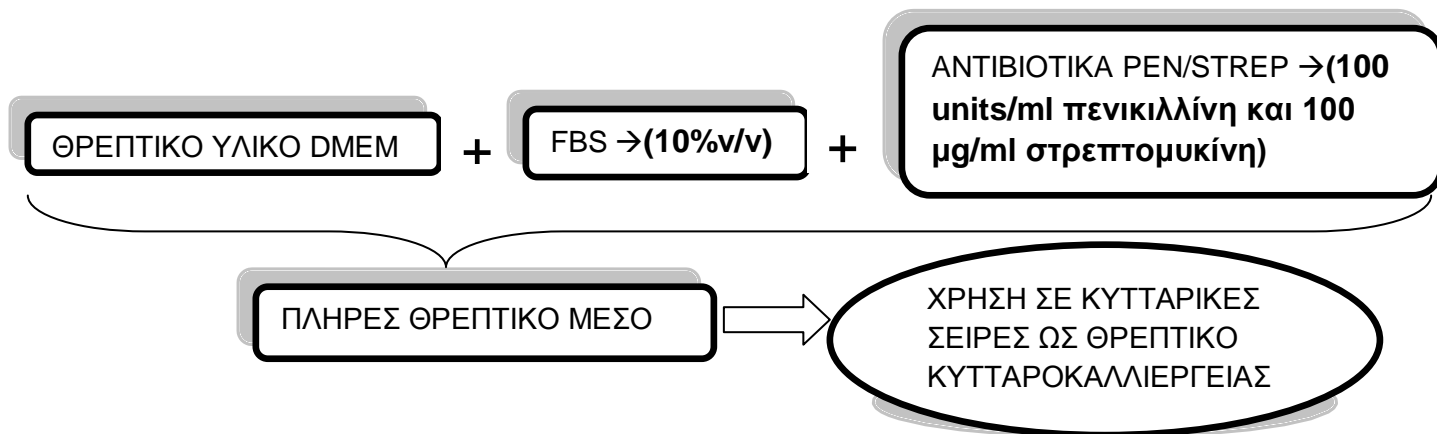
Παράγωγο βετουλινικού οξέος#2		442,72		βετουλινικό οξύ
Παράγωγο βετουλινικού οξέος#3		440,7		βετουλινικό οξύ
Παράγωγο Λουπεόλης#1		424,7		Λουπεόλη
Παράγωγο Λουπεόλης#2		410,72		Λουπεόλη

2. Αντιδραστήρια και θρεπτικά υλικά καλλιέργειας κυττάρων

- **PBS** (Phosphate Buffer Saline 1X): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (εταιρεία Gibco). Περιέχει 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7,2. Χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις των φλασκών πριν την επώαση με θρυψίνη, διότι τα υπολείμματα του πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM περιέχουν FBS (Fetal Bovine Serum) που δρα ανασταλτικά στη δράση της θρυψίνης.
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X): θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων (εταιρεία Gibco). Περιέχει 4.500 mg/L D-γλυκόζης (υδατάνθρακας για πηγή ενέργειας των καλλιεργούμενων κυττάρων), 4 mM L-γλουταμίνη (απαραίτητο αμινοξύ) και 110 mg/L πυροσταφυλικό οξύ (μεταβολικό ενδιάμεσο από την ολοκλήρωση της γλυκολυτικής πορείας που συμμετέχει στην έναρξη του κύκλου του Krebs για αερόβια παραγωγή ATP). Το θρεπτικό υλικό DMEM της εν λόγω εταιρείας έχει ενσωματωμένο κόκκινο της φαινόλης (phenol red) ως δείκτη αλλαγής του pH.
- **FBS** (Fetal Bovine Serum): βόειος εμβρυϊκός ορός (εταιρεία Gibco). Παρέχει στα καλλιεργούμενα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες που

απαιτούνται για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Πριν από τη χρήση του, ο ορός υφίσταται μια σύντομη διαδικασία θερμικής απενεργοποίησης σε υδατόλουτρο (heat block), όπου θερμαίνεται στους 55 °C για 30 λεπτά. Ακολούθως διαχωρίζεται σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) και διατηρείται στους -20 °C. Η τελική περιεκτικότητα του ορού στο πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM είναι 10% v/v (όγκο κατ'όγκον).

- **Αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin).** Παρέχονται από την εταιρεία Gibco σε αρχική συγκέντρωση 100X (10.000 units/ml πενικιλίνη και 10.000 µg/ml στρεπτομυκίνη) Τα αντιβιοτικό σχήμα (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) είναι αρκετά αποτελεσματικό στην προστασία των κυτταρικών σειρών από μόλυνση εξωγενών μικροβιακών παραγόντων. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM + FBS + P/S) είναι 1X (100 units/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη)



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της τελικής σύστασης του πλήρους θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κυττάρων

- **Διάλυμα θρυψίνης 0,5% (10X) σε EDTA** (εταιρεία Gibco). Περιέχει 5.0 gr/L θρυψίνη (1:250), 2 gr/L of EDTA·4Na και 8.5 gr/L of NaCl (10X). Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τη βάση της φλάσκας στην οποία αναπτύσσονται. Το διάλυμα θρυψίνης μετά από αραιώση με PBS σε τελική συγκέντρωση 1X διαχωρίζεται σε μικρές ποσότητες (aliquots) σε σωληνάρια τύπου Falcon που διατηρούνται στους -20 °C.
- **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)** (εταιρεία Sigma). Το DMSO είναι μία χημική ένωση που δρα κρυσταλλοπροστατευτικά, αλλάζοντας τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης εμποδίζοντας το σχηματισμό παγοκρυστάλλων οι οποίοι κατά τη διαδικασία της ψύξης κυττάρων (είτε στους -80 °C, είτε σε υγρό N₂) ευθύνονται για την καταστροφή των κυττάρων. Επομένως η προσθήκη του DMSO κατά τη ψύξη των κυττάρων συνεισφέρει θετικά στην ελαχιστοποίηση των κυτταρικών

απωλειών. Η τελική του συγκέντρωση στο υλικό παγώματος (freezing medium) των κυττάρων είναι 10% v/v (όγκο κατ'όγκον).

- **XTT Cell Proliferation Kit II** (εταιρεία Roche). Χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

3.1 Συντήρηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων HepG2

Τα κύτταρα HepG2 διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια μέσα σε επίπεδες αποστειρωμένες πλαστικές φλάσκες είτε των 25 cm² (T₂₅) είτε των 75 cm² (T₇₅). Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood), επιπέδου βιοασφάλειας II της εταιρείας Tel Star AV-30/70. Ο θάλαμος αυτός επιτρέπει το φιλτράρισμα του αέρα από μικροβιακούς παράγοντες που μπορούν να επιμολύνουν τις κυτταρικές σειρές, εξασφαλίζοντας παράλληλα ασηπτικές συνθήκες. Οι φλάσκες με τα κύτταρα διατηρούνται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο της εταιρείας RS BIOTECH με συνθήκες 37 °C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO₂. Η παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων της εταιρείας Kruss. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τους χειρισμούς των κυττάρων προθερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Η συντήρηση των κυττάρων σε καλλιέργεια γίνεται με ανανέωση του πλήρους θρεπτικού μέσου (DMEM + FBS[10%v/v] + P/S[100 units/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη]) κάθε 2-3 μέρες. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-80% της φλάσκας καλλιέργειας, είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια τους και το πέρασμα σε νέα φλάσκα, μετά από επώαση με θρυψίνη (θρυψινοποίηση). Η διαδικασία της θρυψινοποίησης στοχεύει στην αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα καλλιέργειας καθώς και στην μεταξύ τους αποκόλληση και πραγματοποιείται ως εξής: με τη χρήση γυάλινης αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur που συνδέεται με ειδική αντλία κενού απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα καλλιέργειας και ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα PBS (ενδεικτικά 4 ml για T₂₅ φλάσκα ή 10 ml για T₇₅ φλάσκα), με σκοπό να απομακρυνθούν υπολείμματα πλήρους θρεπτικού υλικού που περιέχουν FBS, ο οποίος μπορεί να ασκήσει ανασταλτική επίδραση στη δράση της θρυψίνης που προστίθεται στο επόμενο στάδιο. Μετά από την απομάκρυνση του PBS προστέθηκε το διάλυμα θρυψίνης (ενδεικτικά 1ml για T₂₅ φλάσκα και 1,5 ml για T₇₅ φλάσκα) και η φλάσκα τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο (37 °C & 5% CO₂) για 2-5 λεπτά ή εναλλακτικά σε θερμοκρασία δωματίου για να δράσει η θρυψίνη. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης η οποία διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς που επιτρέπουν τις διακυτταρικές συνδέσεις αλλά και την πρόσφυση τους στο στερεό υπόστρωμα της φλάσκας. Μετά τη δράση της θρυψίνης τα κύτταρα αναδεύονται ήπια με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, με σκοπό να εξασφαλιστεί η διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και να δημιουργηθεί ένα εναιώρημα μονοκυττάρων (single cell suspension) ώστε να επιτευχθεί η ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων στη νέα φλάσκα καλλιέργειας. Η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται και σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό με

σκοπό την απενεργοποίηση της δράσης της θρυψίνης και πραγματοποιήθηκε επιπλέον ανάδευση με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm για 5 min στους 25 °C για την απομάκρυνση της θρυψίνης. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε ανάδευση με σκοπό τη διάσπαση πιθανών κυτταρικών συσσωματωμάτων. Μια ποσότητα ή το σύνολο των κυττάρων μεταφέρθηκε σε νέες φλάσκες καλλιέργειας (ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος) και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 5 ml για την T₂₅ φλάσκα και 1,5 ml για την T₇₅ φλάσκα. Οι φλάσκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην επιφάνεια της φλάσκας αναγράφεται ο αριθμός του περάσματος (passage) και η ημερομηνία της θρυψινοποίησης.

3.2. Ψύξη κύτταρων

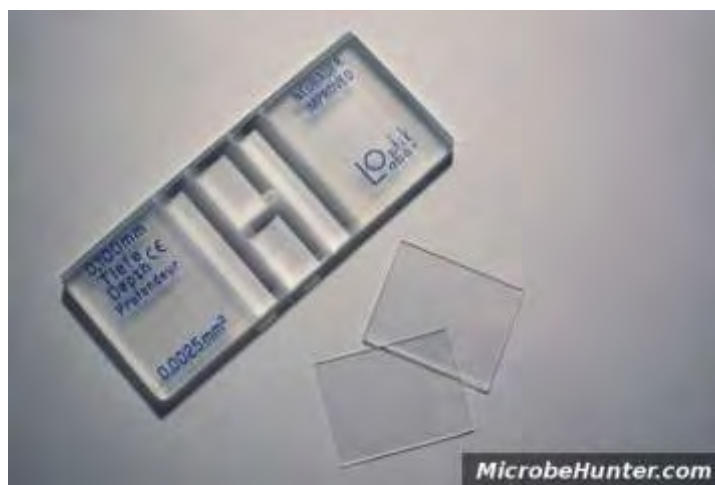
Για την ψύξη των κυττάρων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων της φλάσκας, πραγματοποιείται έκπλυση της φλάσκας με PBS, απομάκρυνση του PBS και προσθήκη 1 ml θρυψίνης για T₂₅ φλάσκα ή 1,5 ml για T₇₅ φλάσκα και επώαση της φλάσκας στους 37 °C σε επωαστικό κλίβανο σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂ με σκοπό τη μεγιστοποίηση της δράσης της θρυψίνης για περίπου 2-5 λεπτά. Όπως προαναφέρθηκε πραγματοποιείται μηχανική ανάδευση των κυττάρων με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας με σκοπό τη διάσπαση κυτταρικών συσσωματωμάτων και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό για την αδρανοποίηση της θρυψίνης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, στους 4 °C, για 5 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε υλικό παγώματος (freezing medium) το οποίο αποτελείται από FBS και 10% v/v (όγκο κατ'όγκον) DMSO. Στη συνέχεια το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε cryovials χωρητικότητας 1 ml. Σε κάθε cryovial αναγράφεται ο αριθμός των περασμάτων και η ημερομηνία παγώματος. Τα cryovials τοποθετήθηκαν στους -20 °C overnight και την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν στους -80 °C ή στο υγρό N₂ για μακροχρόνια συντήρηση. Αξίζει να τονιστεί ότι για την επιτυχή διατήρηση των κυττάρων είτε στους -80 °C ή στο υγρό N₂ πρέπει να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν το πάγωμα και για αυτό το λόγο το πάγωμα πραγματοποιήθηκε όταν τα κύτταρα είχαν λιγότερο από 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας.

3.3 Απόψυξη κυττάρων

Η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων πρέπει να πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, με σχετικά γρήγορους πειραματικούς χειρισμούς για να ελαχιστοποιηθεί στο μέγιστο δυνατό επίπεδο ο κυτταρικός θάνατος. Αρχικά τα παγωμένα κύτταρα που διατηρούνται είτε σε δεξαμενή υγρού N₂, είτε στους -80 °C μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C όπου και αποψύχονται με συνεχή ανακίνηση του σωληναρίου με γρήγορες κινήσεις. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι τύπου falcon χωρητικότητας 15

ml και προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1000 rpm, για 5 min στους 25 °C με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO που παραμένει στο υπερκείμενο και την καθίζηση των κυττάρων ως ίζημα. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό με σταδιακή και ομοιόμορφη εναιώρηση των κυττάρων στο σωληνάριο. Επίσης έγινε μηχανική ανάδευση με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας με σκοπό την διάσπαση των κυτταρικών συσσωματωμάτων και την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων. Τα κύτταρα σε συνολικό όγκο 5 ml μεταφέρθηκαν σε T₂₅ φλάσκα στην οποία αναγράφονται η ημερομηνία απόψυξης και ο αριθμός περάσματος (passage) της κυτταρικής σειράς. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο υπό συνθήκες 37 °C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5 % CO₂.

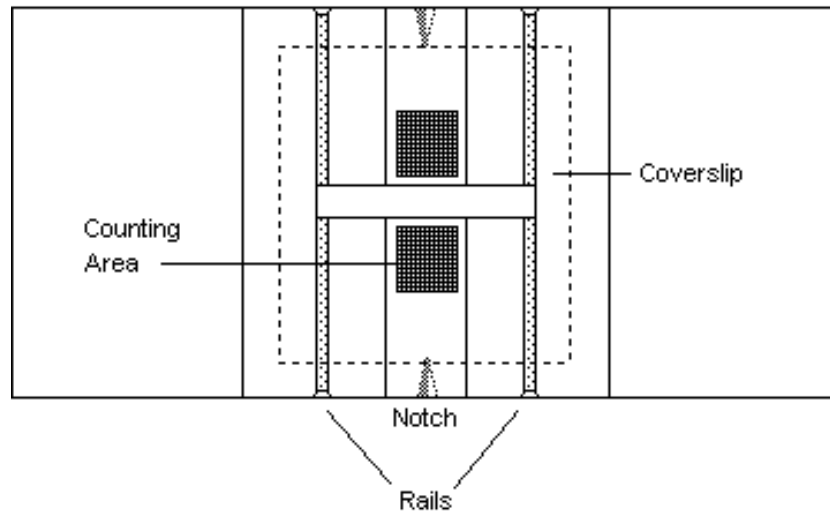
3.4. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο



Εικόνα 9: Αιμοκυτταρόμετρο (πλακίδιο Neubauer)

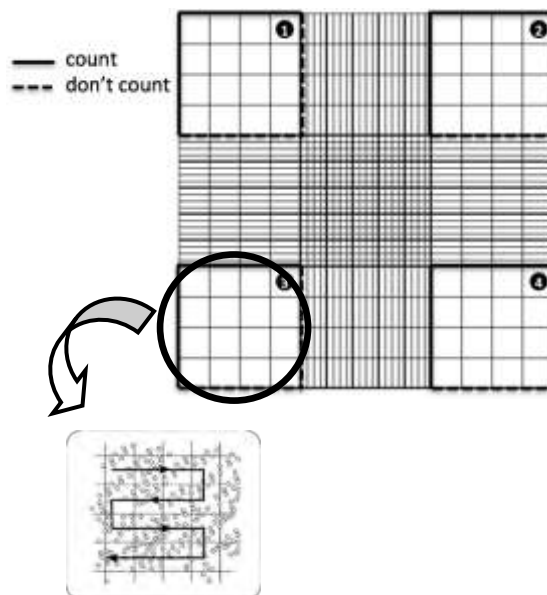
Για τη διεξαγωγή του πειράματος απαιτείται ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων τα οποία θα επιστρωθούν σε τρυβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Αρχικά απομακρύνθηκε το πλήρες θρεπτικό υλικό της φλάσκας, έγινε έκπλυση με PBS, προστέθηκε θρυψίνη και τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα καλλιέργειας, αναδεύονται και μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 15 ml. Μετά από φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια λήφθηκαν με τη χρήση πιπέτας 10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα και τοποθετήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι ένα εργαστηριακό σύνεργο που βρίσκει εφαρμογή στη μέτρηση αριθμού κυττάρων και αρχικά σχεδιάστηκε για το μέτρημα κυττάρων του αίματος. Εφευρέθηκε από τον Louis-Charles Malassez. Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που έχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εσωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.



Εικόνα 10: Δομή αιμοκυτταρόμετρου

Καθεμιά από τις λείες επιφάνειες έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Το κάθε τετράγωνο ορίζεται από 3 παράλληλες γραμμές που χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν αν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του πλέγματος. Επίσης καθένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων. Ξεχωρίζουν 4 γωνιακά τετράγωνα όπου πραγματοποιείται η μέτρηση των κυττάρων. Τα άλλα 5 κύρια τετράγωνα σχηματίζουν ένα σταυρό, γεγονός που βοηθά τον εντοπισμό και τη μέτρηση των κυττάρων αλλά και την παρατήρησή τους κάτω από το μικροσκόπιο.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας ενός αιμοκυτταρόμετρου και ενδεικτική εστίαση σε ένα από τα 4 γωνιακά τετράγωνα

Η διαδικασία του υπολογισμού του αριθμού των κυττάρων έχει ως εξής: αρχικά μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε καθένα από τα 4 γωνιακά τετράγωνα και υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων στο διάλυμα. Στη συνέχεια η συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml υπολογίζεται ως εξής: $[(1 + 2 + 3 + 4)/4] \times 10^4$ κύτταρα/ml.

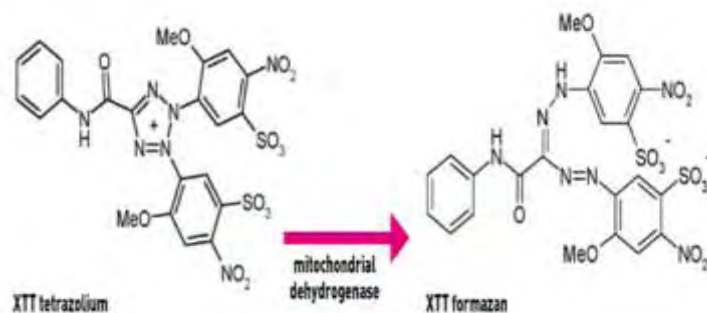
3.5. Ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης με τη βιοδοκιμή ΧΤΤ

3.5.1 Αρχή της μεθόδου

Το «Cell Proliferation Kit II (ΧΤΤ)» της εταιρείας Roche είναι μία χρωματομετρική μέθοδος για τη μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας καθώς και κυτταροτοξικότητας. Το δείγμα μπορεί να είναι κυτταρικό εναιώρημα ή κύτταρα προσκολλημένα που καλλιεργούνται γενικά σε 96-well plates. Η μέθοδος βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ (2H-Tetrazolium,2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-hydroxide).

Η μέθοδος βασίζεται στη διάσπαση του κίτρινου άλατος τετραζολίου ΧΤΤ παρουσία ενός αντιδραστηρίου σύζευξης ηλεκτρονίων (electron coupling reagent) με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας πορτοκαλί υδατοδιαλυτής χρωστικής που ονομάζεται φορμαζάνη. Η πορτοκαλί αυτή χρωστική απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και έτσι με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου τύπου «multi-well Elisa reader» μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση της έντασης της χρωστικής που ουσιαστικά είναι συνάρτηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Το πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν άλλα άλατα τετραζολίου (π.χ. ΜΤΤ) είναι ακριβώς το γεγονός ότι η διάσπαση του ΧΤΤ δίνει μια υδατοδιαλυτή ένωση και έτσι δεν απαιτείται το βήμα της διαλυτοποίησης. Επιπλέον παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία καθώς επιτρέπει την ανίχνευση μικρού αριθμού κυττάρων, είναι ακριβής με την έννοια ότι η απορρόφηση που λαμβάνεται συσχετίζεται στενά με τον αριθμό των κυττάρων, είναι ασφαλής καθώς αποκλείει την χρήση ραδιενεργών ισotόπων και επιτρέπει τη διαχείριση και επεξεργασία πληροφοριών από μεγάλο αριθμό δειγμάτων δεδομένης της χρήσης του φασματοφωτόμετρου «multi-well Elisa reader». Η μέθοδος αυτή βρίσκει επίσης εφαρμογή στην εξέταση της κυτταρικής ανάπτυξης σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες ή θρεπτικές ουσίες.

Η αντίδραση μετατροπής του ΧΤΤ σε φορμαζάνη πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα όπου λειτουργούν οι μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες. Ουσιαστικά η αύξηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, συνεπάγεται και αύξηση της ολικής δραστηριότητας των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών στο δείγμα. Αυτό αντιπροσωπεύεται από την ένταση του χρώματος της πορτοκαλί χρωστικής (φορμαζάνης) που σχηματίζεται (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μεταβολισμός του ΧΤΤ στην υδατοδιαλυτή χρωστική φορμαζάνη από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες

3.5.2 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης που βασίζεται στο αντιδραστήριο ΧΤΤ διαρκεί συνολικά 3 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιήθηκε επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυτάρων σε τρυβλίο 96 θέσεων (96 well-plate). Συγκεκριμένα όπως έχει αναφερθεί σε προγενέστερο στάδιο αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της μέτρησης των κυτάρων, ακολούθησε μία σειρά υπολογισμών που ως αποτέλεσμα είχε τον προσδιορισμό (σε μl) των ποσοτήτων του κυτταρικού εναιωρήματος και πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM που χρειάστηκαν για τη διαδικασία της επίστρωσης των κυτάρων σε 96-well plate. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε σε ένα σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml, ένα μείγμα με κύτταρα και φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM. Στο falcon πραγματοποιήθηκε έντονη μηχανική ανάδευση με χρήση πιπέτας για την διάσπαση πιθανών κυτταρικών συσσωματωμάτων και κατ'επέκταση για την ομοιόμορφη κατανομή των κυτάρων. Με άλλα λόγια οι υπολογισμοί αποσκοπούσαν στον προσδιορισμό του όγκου που αναλογεί σε 30.000 κύτταρα, τα οποία τοποθετήθηκαν σε 150 μl (λήφθηκαν από το προαναφερθέν μείγμα) πλήρους θρεπτικού υλικού (DMEM + P/S + FBS) στο κάθε πηγαδάκι στο 96-well plate. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν ακολούθως σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37 °C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5 % CO_2 και αφέθηκαν για 24 ώρες στον επωαστήρα για να προσκολληθούν στον πυθμένα του πιάτου καλλιέργειας.

Την δεύτερη ημέρα πριν την προσθήκη των εξεταζόμενων ενώσεων παρατηρήθηκε το πιάτο καλλιέργειας σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων ώστε να διασφαλιστεί η προσκόλληση και η ομοιόμορφη κατανομή των κυτάρων στα πηγαδάκια και η απουσία κυτταρικών συσσωματωμάτων. Ακολούθως παρασκευάστηκαν αραιώσεις των υπό εξέταση ενώσεων σε θρεπτικό υλικό DMEM, χωρίς ορό, παρουσία αντιβιοτικών στη συγκέντρωση των 25 μM σε τελικό όγκο 100 μl . Μετά από προσεκτική αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το κάθε πηγαδάκι, προστέθηκαν τα 100 μl του δείγματος και κάθε δείγμα μελετήθηκε τουλάχιστον εις διπλούν (duplicates-triplicates). Επίσης κατά την προετοιμασία των δειγμάτων παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου (controls) τα οποία αποτελούνταν από θρεπτικό με αντιβιοτικά χωρίς ορό και DMSO απουσία εξεταζόμενων ενώσεων (το DMSO χρησιμοποιήθηκε καθώς όλες οι ενώσεις έχουν διαλυθεί σε DMSO). Τα δείγματα αυτά αποτελούν τα δείγματα αρνητικού ελέγχου (negative control). Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ως δείγμα θετικού ελέγχου (positive control), ως δείγμα ελέγχου του κυτταρικού θανάτου, ένα πηγαδάκι στο οποίο τα κύτταρα επωάζονταν με το γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο ετοποσίδη (σε τελική συγκέντρωση 10 μM), και στο δείγμα αυτό αναμένεται να επέλθει πλήρως κυτταρικός θάνατος. Το τρυβλίο 96 θέσεων με τα κύτταρα και τις εξεταζόμενες ενώσεις τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37 °C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5 % CO_2 για 24 ή 48 ώρες.

Την τρίτη ημέρα μετά την πάροδο των 24 ή 48 ωρών επώασης με τις ουσίες (τριτερπενοειδή), χρησιμοποιήθηκε το «Cell Proliferation Kit II(XTT)» της εταιρείας Roche με στόχο την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης. Το kit της συγκεκριμένης εταιρείας έχει 2 αντιδραστήρια: το άλας τετραζολίου ΧΤΤ και ένα αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων (electron coupling reagent). Τα 2 αυτά αντιδραστήρια μετά από απόψυξη σε υδατόλουτρο στους 37 °C αναμίχθηκαν με αναλογία 50 μl από το ΧΤΤ και 1 μl από το αντιδραστήριο

σύζευξης ηλεκτρονίων και από το μείγμα προστέθηκαν 50 μl σε κάθε πηγαδάκι του τρυβλίου. Ακολούθησαν 4 ώρες επώασης σε επωαστήρα με συνθήκες 37 °C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5 % CO₂. Ακολούθως το 96-well plate τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο του τύπου «multi-well Elisa Reader» και ελήφθησαν τιμές απορρόφησης σε μήκος κύματος φασματοφωτομέτρησης τα 450 nm και μήκος κύματος αναφοράς (background) τα 630 nm με τη βοήθεια του λογισμικού «Gen5».

3.6 Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με σκοπό τον υπολογισμό του ποσοστού επί της εκατό (%) αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παρουσία ή απουσία (control) των ουσιών που μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές των απορροφήσεων που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία στα 450 και στα 630 nm. Πραγματοποιήθηκαν οι κάτωθι υπολογισμοί:

- ✓ OD_{control}: τιμή απορρόφησης του δείγματος ελέγχου ⇒ προέκυψε από τον υπολογισμό του μέσου όρου των διαφορών των δειγμάτων ελέγχου στα 450 και στα 630 nm, απουσία ουσιών (στα πηγαδάκια που περιέχουν μόνο κύτταρα με DMEM + P/S και απουσία ενώσεων)
- ✓ OD_{δείγματος}: τιμή απορρόφησης των υπό εξέταση δειγμάτων ⇒ προέκυψε από τον υπολογισμό του μέσου όρου των διαφορών των υπό εξέταση δειγμάτων στα 450 και στα 630 nm, παρουσία ουσιών (στα πηγαδάκια που περιέχουν κύτταρα, παρουσία DMEM + P/S και τις υπό εξέταση ενώσεις)

Τελικά το επί τοις εκατό (%) ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{Αναστολή} = \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{δείγματος}}}{OD_{\text{control}}} \times 100$$

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.

3.7 Έλεγχος μυκοπλάσματος σε κύτταρα HepG2

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα έλεγχος της κυτταρικής σειράς HepG2 για μόλυνση τόσο από εξωγενείς βακτηριακούς παράγοντες όσο και από μυκόπλασμα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από κύτταρα HepG2 με τη χρήση του πειραματικού kit της εταιρείας Invitrogen. Έπειτα, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της μόλυνσης των κυττάρων από μυκόπλασμα με κατάλληλο ζεύγος εκκινητικών μορίων που υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μυκοπλάσματος. Παράλληλα στην PCR χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ποιότητας και ποσότητας DNA, η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την προθρομβίνη, με ζεύγος εκκινητών που υβριδίζονται σε καθορισμένη αλληλουχία του γονιδίου της προθρομβίνης. Το τελευταίο αποσκοπούσε στον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της PCR.

Τα βασικά υλικά της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- **Buffer** (ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από την εταιρεία Kapa Biosystems) Το ρυθμιστικό διάλυμα εξασφαλίζει ένα σταθερό εύρος pH που είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα της Taq πολυμεράσης
- **dNTPs** (δεοξυ-τριφωσφορικά νουκλεοτίδια συγκέντρωσης 10 mM). Τα dNTPs αποτελούν τα δομικά μονομερή που αξιοποιούνται από την Taq πολυμεράση για τη σύνθεση των νέων κλώνων DNA κατά την ενίσχυση με PCR
- **Εκκινητές** (συγκέντρωσης 50 pmole/μl). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος εκκινητών: forward (5' CCRTGCACCACTGTCWHHHHBGWWAACCTC 3') και reverse (5' GAA AGY GTG GGG AGC AAA YAG GAT TAG ATA CCCT 3') αφορούσε την ενίσχυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μυκοπλάσματος (**260 bp**) και το άλλο ζεύγος: forward (5' TCT AGA AACAGTTGCCTGGC 3') και reverse (5' ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC 3') αφορούσε την ενίσχυση του γονιδίου της προθρομβίνης (**340 bp**)
- **Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂)** (συγκέντρωσης 25 mM). Το άλας με την διάστασή του δίνει Mg⁺² τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντας απαραίτητος για τη δράση της Taq πολυμεράσης
- **Taq πολυμεράση** (συγκέντρωσης 5 U/μl). Απομονώθηκε από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήθηκε για την επέκταση-πολυμερισμό των νεοσυντιθέμενων DNA κλώνων κατά την ενίσχυση με PCR.
- **Απιονισμένο νερό**
- **Εκμαγείο DNA**

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl, και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) τελικής συγκέντρωσης 1 X, dNTPs τελικής συγκέντρωσης 0,4mM, forward εκκινητή 50 pmole, reverse εκκινητή 50 pmole, χλωριούχο μαγνήσιο 2 mM και 1 Unit Taq πολυμεράσης .

Τα βασικά στάδια στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR ήταν:

- Αποδιάταξη του εκμαγείου DNA (95 °C → 1,5/5 min)

Ακολουθούν συνολικά 40 κύκλοι όπου σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται:

- ❖ Αποδιάταξη του εκμαγείου στους 95 °C για 30 sec
- ❖ Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 55 °C για 30 sec
- ❖ Πολυμερισμός-επέκταση στους 72 °C για 30 sec

Οι θερμοκρασιακές εναλλαγές διεξήχθησαν στην ειδική συσκευή- θερμοκυκλοποιητή Thermo cycling (SENSQUEST lab cyclder).

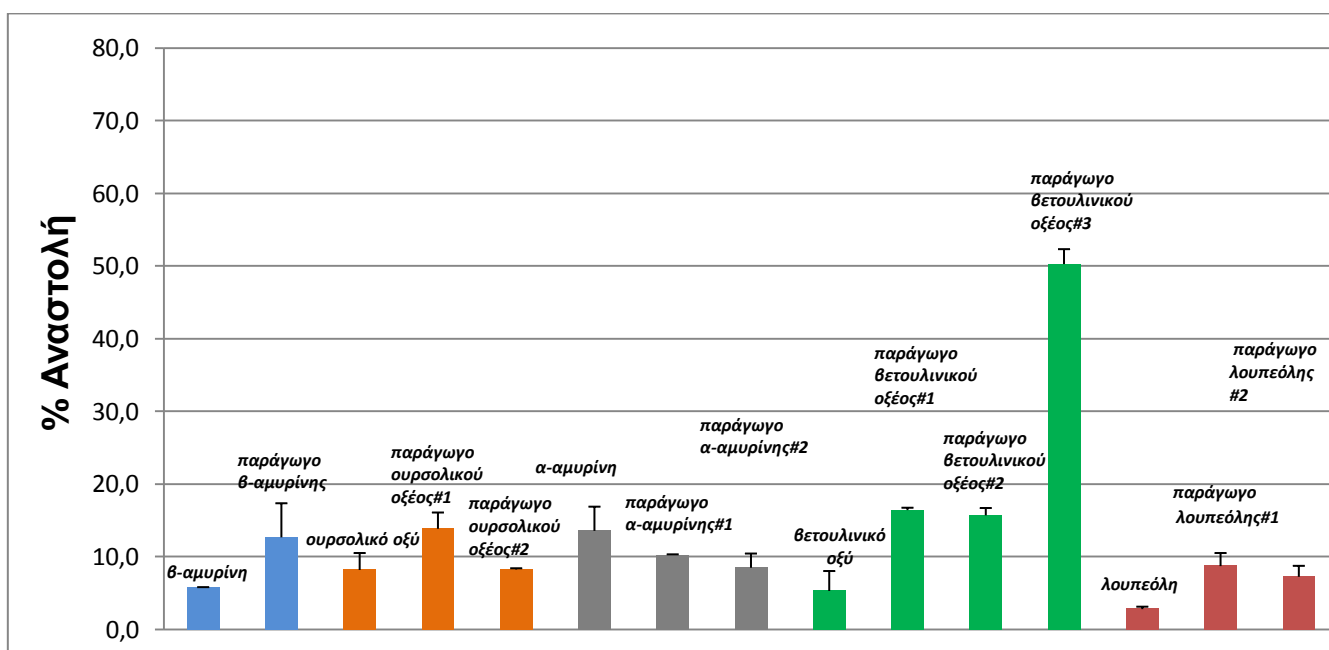
Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % w/v. Για τη δημιουργία του πήκτωματος αγαρόζης ζυγίστηκαν 1,2 gr αγαρόζης τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X **TAE** (διάλυμα 50X: Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57.1 ml), EDTA (18.6 gr), ddH₂O μέχρι 1 L. pH: 8). Τέλος στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν βρωμιούχο αιθίδιο τελικής συγκέντρωσης 0,5 µg/ml, το οποίο εξασφάλισε την οπτικοποίηση των ζωνών στην ηλεκτροφόρηση παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης, απαιτείται η ανάμειξη τους με ένα διάλυμα φόρτωσης ή Loading Buffer σε τελική συγκέντρωση 1X (το διάλυμα 6X περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης και 30% w/v γλυκερόλη). Επίσης, μαζί με τα δείγματα είναι απαραίτητη και η φόρτωση ενός δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (Low Molecular DNA Ladder). Τα μεγέθη των ζωνών που περιέχει είναι γνωστά και σύμφωνα με αυτά και ανάλογα με τη θέση κάθε ζώνης υπολογίζεται το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας ερευνητικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες απομονωμένοι από φυτικούς οργανισμούς και συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν τα καθαρά τριτερπενοειδή: α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, βετουλινικό οξύ, ουρσολικό οξύ και λουπεόλη, καθώς και, ημισυνθετικά παράγωγα αυτών 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 κυτάρων HepG2 με τα υπό εξέταση φυσικά και ημισυνθετικά τριτερπενοειδή, σε τελικές συγκεντρώσεις 1, 10 και 25 μM στα καρκινικά κύτταρα. Η πειραματική εργασία ξεκίνησε επιλέγοντας την υψηλότερη τελική συγκέντρωση των 25 μM για όλες τις ενώσεις. Για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης, οι παραπάνω ενώσεις αραιώθηκαν με θρεπτικό DMEM και αντιβιοτικά, απουσία ορού. Μετά το πέρας του 24ώρου πραγματοποιήθηκε χρήση της βιοδοκιμής ΧΤΤ.

Τα αποτελέσματα μετά από υπολογισμό της % αναστολής της ανάπτυξης των κυτάρων HepG2 από τα τριτερπενοειδή που μελετήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 25 μM , συνοψίζονται στο γράφημα 1.



Γράφημα 1: % Αναστολή ανάπτυξης κυτάρων HepG2 συναρτήσει φυσικών και ημισυνθετικών τριτερπενοειδών σε συγκέντρωση 25 μM .

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω γράφημα 1 τόσο η β-αμυρίνη όσο και το ημισυνθετικό της παράγωγο προκάλεσαν 5,7% και 12,7% αντίστοιχα αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2, τιμές που δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Η συγκεκριμένη δομική αλλαγή που πραγματοποιήθηκε στο παράγωγο της β-αμυρίνης δεν φαίνεται να ενισχύει τη δραστηριότητα της αρχικής ένωσης.

Παρομοίως, το ουρσολικό οξύ και τα ημισυνθετικά του παράγωγα #1 και #2 προκάλεσαν αντίστοιχα μικρή και μη στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστά 8,2%, 13,8% και 8,3%. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στην συγκεκριμένη συγκέντρωση των 25 μΜ οι ενώσεις αυτές δεν επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Για την α-αμυρίνη και τα παράγωγά της #1 και #2 η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης εκτιμήθηκε σε ποσοστά 13,6%, 10,3% και 8,5% αντίστοιχα, τιμές που δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Όπως και στην περίπτωση της α-αμυρίνης, οι συγκεκριμένες δομικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στα παράγωγα #1 και #2 της β-αμυρίνης δεν καταλήγουν στην ενίσχυση της δραστηριότητας της.

Ομοίως η λουπεόλη και τα δύο ημισυνθετικά της παράγωγα #1 και #2 προκάλεσαν μικρή αναστολή στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, με τιμές 2,8%, 8,7% και 7,2% αντίστοιχα.

Τέλος, το βετουλινικό οξύ και τα δύο ημισυνθετικά παράγωγα #1 και #2 προκάλεσαν μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, με τιμές μη στατιστικά σημαντικές (ποσοστά αναστολής 5,3%, 16,4% και 15,7% αντίστοιχα). Ωστόσο, το παράγωγο #3 του βετουλινικού οξέος στην ίδια τελική συγκέντρωση (25 μΜ) προκάλεσε στατιστικά σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων HepG2 σε ποσοστό 50,3%.

Συνεχίζοντας είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα υπό εξέταση φυσικά τριτερπενοειδή καθώς και για τα ημισυνθετικά παράγωγα αυτών που δεν παρουσίασαν σημαντική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης δεν χορηγήθηκαν στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 1 μΜ και 10 μΜ. Με βάση το γεγονός ότι στην συγκέντρωση των 25 μΜ μία ένωση (το παράγωγο #3 του βετουλινικού οξέος) εμφάνισε δραστηριότητα και ανέστειλλε σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2, δεν κατέστη απαραίτητο οι υπόλοιπες ενώσεις να εξεταστούν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της τιμής των 25 μΜ. Το συγκεκριμένο παράγωγο (#3) του βετουλινικού οξέος υπολογίστηκε ότι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, με τιμή IC₅₀ ίση με 25 μΜ (καθώς απαιτούνται 25 μΜ της ένωσης αυτής για να επιτευχθεί το 50% της αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης στα ανθρωπινά ηπατικά καρκινικά κύτταρα HepG2). Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο παράγωγο (#3) του βετουλινικού οξέος δεν φαίνεται ότι δρα με χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο, καθώς η επώαση των κυττάρων HepG2 για 24 και 48 ώρες με την ένωση αυτή προκάλεσε το ίδιο ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης.

Γενικότερα, τα ημισυνθετικά παράγωγα ενώσεων που εξετάζονται ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα, δοκιμάζονται επειδή σε μια πλειονότητα περιπτώσεων οι φυσικές ενώσεις παρουσιάζουν ασθενή δραστηριότητα 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 δραστηρών ενώσεων. Στην παρούσα ερευνητική εργασία μόνο ένα ημισυνθετικό παράγωγο του βετουλινικού οξέος, παρατηρήθηκε ότι καταδεικνύει ισχυρή αντικαρκινική δράση σε ανθρώπινα κύτταρα HepG2. Είναι εμφανές ότι η χημική

τροποποίηση, που αφορά στην αφαίρεση της ομάδας υδροξυλίου στη συγκεκριμένη θέση, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της ημισυνθετικής ένωσης σε σύγκριση με το αρχικό μόριο. Αυτό επίσης συνεπάγεται και αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων HepG2 στην ένωση αυτή δεδομένης της μικρής τελικής συγκέντρωσης που απαιτείται για την πρόκληση κυτταροτοξικότητας.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες οι οποίες έχουν εστιαστεί αναλυτικά στα συγκεκριμένα φυσικά τριτερπενοειδή της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα 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 (*Eichenmüller M et al., 2009*). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής (Γράφημα 1). Μελέτες που επικεντρώθηκαν στο ουρσολικό οξύ ανέδειξαν ότι η συγκεκριμένη ένωση παρουσίασε αντι-ηπατοκαρκινική δράση εναντίον κυττάρων HepG2 μέσω απόπτωσης και παύσης του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G₀/G₁. Όσον αφορά την λουπεόλη προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγησή της σε κύτταρα HepG2 οδήγησε σε αύξηση της κυτταροτοξικότητας με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, και κατέληξαν ότι 48,5 µmol/l προκαλούν 50% αναστολή κυτταρικής ανάπτυξης (*Yan H et al., 2011*). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μελέτης, αλλά μπορούν να εξηγηθούν κυρίως λόγω διαφοράς στην τελική συγκέντρωση της λουπεόλης (25 µM στην παρούσα εργασία και 48,5 µmol/l στην εργασία των Yan et al.).

Δ. 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 μελετήθηκε η δράση πέντε πολύ σημαντικών καθαρών τριτερπενοειδών ουσιών (α-αμυρίνη, β-αμυρίνη, ουρσολικό οξύ, λουπεόλη, βετουλινικό οξύ) καθώς και ημισυνθετικά παράγωγα αυτών με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής αναστολής ανάπτυξης των ανθρώπινων ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2. Η πιο δραστική ένωση που ταυτοποιήθηκε ήταν το παράγωγο #3 του βετουλινικού οξέος με τιμή IC50 της τάξεως των 25 μM. Η χημική τροποποίηση που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση (αφαίρεση μιας ομάδας υδροξυλίου) επιδρά στη σχέση δομής-λειτουργίας τροποποιώντας τη λειτουργία του φυσικού βετουλινικού οξέος σε μια ένωση με σαφώς προσδιορισμένη αντικαρκινική δράση εναντίον των κυττάρων HepG2, χαρακτηριστικό που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα φυσικά και ημισυνθετικά τριτερπενοειδή που εξετάστηκαν.

Με υπόβαθρο τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα είναι σημαντικό να τονιστεί ότι απαιτείται περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* προκλινική έρευνα των υπό εξέταση τριτερπενοειδών για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Επιπροσθέτως, 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 συμβάλλει στην αποκρυπτογράφηση ενός ευρέος δικτύου αντικαρκινικής δραστηριότητας των υπό εξέταση τριτερπενίων, αποκαλύπτοντας δράσεις εναντίον διαφόρων τύπων ανθρώπινου καρκίνου.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, 2000* ,The Hallmarks of Cancer, Cell , Vol.100, 57-70
- *Roberta Pang and Ronnie T.P. Poon, 2006*, Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma, Cancer Letters, Vol.242, 151-167
- Cairns J : Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, Nature, 255: 197-200
- Potter VR : Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: an examination of the Solt-Farber protocol,1984, Cancer Res, 44: 2733-2736
- Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki, 16: 183-184
- Loewenstein WR : Junctional intercellular communication and the control of growth, 1979, Biochim Biophys Acta, 560: 1-65
- Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, Jpn J Physiol, 35: 693-707
- Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, Cancer Res, 47: 1473-1487
- 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
- Potter VR : A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver, 1981, Carcinogenesis, 2: 1375-1379
- Miller DR, Viaje A, Aldaz CM, Conti CV and Slaga TJ : Terminal differentiation resistant epidermal cells in mice undergoing two-stage carcinogenesis, 1987, Cancer Res, 47: 1935-1940

- Trosko JE and Chang CC: Stem cell theory of carcinogenesis, 1989, Toxicol Lett, 49: 283-295
- Trosko JE, Chang CC and Medkalf A : Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, 1983, Cancer Invest, 1: 511-526
- Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R and Yuspa SH : Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters, 1983, Nature, 304: 67-69
- Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC and Cavenee WK : Loss of heterozygosity in the embryonal tumours suggests a common pathogenic mechanism, 1985, Nature, 316: 330-334
- Marx J: Many gene changes found in cancer, 1989, Science, 246: 1386-1388
- Roslin J Thoppil, Anupam Bishayee: Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer, 2011, World J Hepatol, 39:228-249
- Hidenori Shiraha et al: Human hepatocyte carcinogenesis (Review), 2013, International Journal of Oncology, 42:1133-1138
- Moolgavkar SH: Model for human carcinogenesis: action of environmental agents, 1983, Environ Health Perspect, 50: 285-291
- Yamasaki H: Role of GAP-Junctional Intercellular Communication In Malignant Cell Transformation. In Modern Cell Biology:Gap junctions (Hertzberg EL, Johnson RG, eds). Alan R. Liss, New York, 1988, pp: 449
- Benedetti A, Malvalsi G, Fulceri R and Comporti M: 1984: Loss of lipid peroxidation on a histochemical marker for preneoplastic hepatocellular foci of rats, Cancer Res, 44: 5712-5717
- Linklon Taiz and Eduardo Zeiger: 2010, Φυσιολογία Φυτών, Vol.5, Εκδόσεις Utopia
- Kosmas Haralampidis et al.:2002: Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants, Advances in biochemical bioengineering/Biotechnology, Vol.75
- Zheng, Y., Huang, W., Yoo, J., Ebersole, J. L. & Huang, C. B. (2011). Antibacterial compounds from *Siraitia grasvenorii* leaves, *Natural Products Research*, 25(9): 890-897.
- El-Hagrassi, A. M., Ali, M. M., Osman, A. F. & Shaaban, M. (2011). Phytochemical investigation and biological studies of *Bombax malabaricum* flowers, *Natural Products Research*, 25(2): 141-151.
- Simone Fulda et al., 2009: Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers, Drug discovery, Vol.14

- Sheng-lei Yan et al.,2009: Oleanic and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicology in Vitro*, 24:842-848
- L.Novotny et al.,2001, Ursolic acid: An anti-tumorigenic and chemopreventive activity minireview, *Neoplasma*
- Z.Ovesna et al.,2004, Pentacyclic triterpenoid acids: new chemoprotective compounds minireview, *Neoplasma*
- Mohammad Saleem, 2009: Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene, *Cancer Lett.*, 285(2):109-115
- Eichenmüller M, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells.*Int J Oncol* 2009; 35: 873-879
- Yan H_E et al., 2011: Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Lupeol, a Dietary Triterpene, in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *Biol.Pharm.Bull*,34(4) 517-522
- L.H. Vazquez et al., 2012: The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*
- Mansour Ghaffari Moghaddam et al., 2012: Biological Activity of Betulinic Acid: A Review, *Pharmacology & Pharmacy*, 3:119-123
- Vitor et al., 2009: Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes α - and β - amyryn, in a mouse model of colitis, *British Journal of Pharmacology*, 157:1034-1044
- Holanda Pinto et al., 2008: Anti-inflammatory effect of α,β -Amyryn, a pentacyclic triterpenes from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis, *Inflammopharmacology*, 16:48-52
- Ching et al., 2010, β -Amyryn from *Ardisia elliptica* Thunb. Is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48:275-279
- Rosas-Acevedo et al., 2011, Anti-ulcer activity of *Cytocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats, *Journal of Ethnopharmacology*,134:67-73
- Csapi et al., 2010, Bioactivity guided isolation of anti-proliferative compounds from *Centaurea arenaria*, *Phytotherapia Research*, 24:1664-1669
- Thao et al., 2010: Triterpenoids from *Camellia japonica* and Their Cytotoxic Activity, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 58(1):121-124
- T.Fujioka et al., 1994, "Anti-AIDS Agents, II. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzygium Claviform*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids", *Journal of Natural Products*, Vol.157, No.2, pp. 243-247
- W.Schuhly et al., 1999, New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*, *Planta Medica*, Vol.65, No.8, pp.740-743
- 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
- D. Kumar, S. Mallick, J. R. Vedasiromoni and B. C. Pal, "Anti-Leukemicactivity of *Dillenia indica* L. Fruit Ex- tract and Quantification of Betulinic Acid by HPLC," *Phytomedicine*, Vol. 17, No. 6, 2010, pp. 431-435.

- H. Liu, S. Wang, B. Cai and X. Yao, "Anticancer Activity of Compounds Isolated from *Engelhardtia serrata* Stem Bark," *Archives of Physiology and Biochemistry*, Vol. 42, No. 7, 2004, pp. 475-477.
- L. Fu, S. Zhang, N. Li, J. Wang, M. Zhao, J. Sakai, T. Hasegawa, T. Mitsui, T. Kataoka, S. Oka, M. Kiuchi, K. Hirose and M. Ando, "Three New Triterpenes from *Nerium oleander* and Biological Activity of the Isolated Compounds," *Journal of Natural Products*, Vol. 68, No. 2, 2005, pp. 198-206
- Fulda, S. et al. (1998) Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* 273, 33942–33948
- Kassi, E., Papoutsis, Z., Pratsinis, H., Aligiannis, N., Manoussakis, M., Moutsatsou, P.,
- 2007. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133, 493–500
- Chadalapaka, G., Jutooru, I., McAlees, A., Stefanac, T., Safe, S., 2008. Structure dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18, 2633–2639
- Xavier, C.P., Lima, C.F., Preto, A., Seruca, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2009. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Letters* 281, 162–170
- Gao, X., Deeb, D., Jiang, H., Liu, Y., Dulchavsky, S.A., Gautam, S.C., 2007. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. *Journal of Neuro-oncology* 84, 147–157
- ES-SAADY et al., 1996: MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts, *Anticancer Res*, 16:481-486
- KIM DK, BJEK JH, KANG CM, Yoo MA, SUNG JW, CHUNG HY, KIM ND, CHOI YH, LEE SH, KIM KW. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int J Cancer* 2000; 87: 629-636.
- Chiang LC et al., 2003: Anti-leukemic activity of selected natural products in Taiwan, *Am J Chinese Med*, 31:37-46
- Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Almeida JR, de Queiroz LP. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1216–1221
- Sultana S, Saleem M, Sharma S, Khan N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *Indian J Exp Biol* 2003;41:827–831.
- Nigam N, Prasad S, Shukla Y. Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin. *Food Chem Toxicol* 2007;45:2331–2335
- Saleem M, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Lupeol modulates NF-kappa B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004;23:5203–5214

- Cmoch P, Pakulski Z, Swaczynová J, Strnad M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr Res* 2008;343:995–1003