



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΠΥΡΟΥ ΑΡΓΥΡΗ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (*VITIS VINIFERA*) ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ  
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΟΣ ΗΕΡG2**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Στάγκος(επιβλέπων):** Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Καλλιόπη Λιαδάκη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### ***Ευχαριστίες***

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε η διπλωματική μου εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την πολύ καλή συνεργασία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
<b><u>A' ΜΕΡΟΣ</u></b> .....	5-23
1) ΓΕΝΙΚΑ: ΣΤΑΦΥΛΙΑ.....	5
2) ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	8
3)ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	13-17
3α) Γενικά.....	13
3β) Καρκίνος του ήπατος.....	15
4)ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	18-23
1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.....	18
2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου.....	18
3. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.....	20
5)ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
6)ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	24
<b><u>B' ΜΕΡΟΣ</u></b> .....	25-54
1) ΥΛΙΚΑ.....	25
1α. Χημικά αντιδραστήρια.....	25
1β. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος.....	25
2) ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26-27
2α. Μέθοδος ΧΤΤ.....	26
2β. Μεθοδολογία.....	26
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
I) Διαγράμμα για κάθε εκχύλιμα της %Αναστολής σε σχέση με τα μg/ml του κάθε εκχυλίσματος.....	29-50
II) Πίνακας εκχυλισμάτων.....	51
Συνολικό διάγραμμα που περιλαμβάνει όλα τα εκχυλίσματα και τα IC50 τους	
4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55-59

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια τα σταφύλια και το κρασί έχουν κερδίσει γενικότερο ενδιαφέρον, για τις ευεργετικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές δράσεις που τους αποδίδονται, κυρίως λόγω των πολυφαινόλων που περιέχουν. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι η αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα αμπέλου έχουν αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν προέρχονται από τον καρπό του φυτού και κυρίως από τα γίγαρτα. Υπάρχουν όμως μελέτες που δείχνουν ότι και οι βόστρυχοι του φυτού είναι πλούσιοι σε φυτικές πολυφαινόλες που είναι και οι κύριες βιοδραστικές ουσίες της αμπέλου. Στη βιβλιογραφία όμως δεν υπάρχει καμία μελέτη σχετικά με την πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους αμπέλου. Έτσι, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση της επίδρασης 15 εκχυλισμάτων από βόστρυχους αμπέλου από διάφορες ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*) στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG2). Επίσης, εξετάστηκαν και 5 εκχυλίσματα από γίγαρτα και 2 εκχυλίσματα από στέμφυλα προκειμένου να συγκριθεί η δράση των εκχυλισμάτων από βόστρυχους με αυτή των εκχυλισμάτων από άλλα μέρη του φυτού. Η επίδραση των 22 αυτών εκχυλισμάτων στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων εκτιμήθηκε με την χρήση της μεθόδου ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα των βόστρυχων μπορούσαν να αναστείλουν σε μικρές συγκεντρώσεις που ήταν συγκρίσιμες με αυτές των εκχυλισμάτων από γίγαρτα την αύξηση των HepG2 κυττάρων και άρα διαθέτουν χημειοπροστατευτική δράση.

## ΓΕΝΙΚΑ

### Α' ΜΕΡΟΣ

#### 1. ΣΤΑΦΥΛΙΑ



Εικόνα: Σταφύλια των ποικιλιών Μανδηλαριά Σαντορίνης (αριστερά) και Ασύρτικο Σαντορίνης (δεξιά).

Αποτελεί τον καρπό του αμπελιού (στα λατινικά *VITIS VINIFERA*) που ήταν γνωστό από την παλαιολιθική εποχή και βρίσκονταν σε αφθονία στην πολιτική ζώνη με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην Ισλανδία και τη Βόρεια Ευρώπη. Με την εμφάνιση των παγετώνων, οι τοποθεσίες καλλιέργειας αμπελιών διαφοροποιήθηκαν και σήμερα το συναντάμε στις μεσογειακές χώρες, την νότια Αφρική αλλά και στα ζεστά μέρη της Βόρειας Αμερικής.

Το σταφύλι είναι η ωφελιμότερη τροφή του ανθρώπου και πολύ δίκαια λέγεται βασιλιάς των φρούτων, γιατί είναι η πιο πλούσια σε βιταμίνες κι οργανικά άλατα που χρειάζεται το σώμα από κάθε άλλο είδος τροφής. Τα αμέτρητα κύτταρα που αποτελούν τον οργανισμό προμηθεύονται τα θρεπτικότερα συστατικά από τα σταφύλια που τα ανανεώνουν και τα ζωογονούν σύντομα. Τα καινούργια δε κύτταρα που με την εναλλαγή της ύλης αντικαθιστούν τα γερασμένα και φθαρμένα, αποκτούν νέα ζωτικότητα, ελαστικότητα κι ακμή κι επομένως οι ίνες και οι ιστοί απαλλάσσονται από την τραχύτητα, οι αρτηρίες και τα νεύρα ελευθερώνονται από τη σκλήρυνση, οι μυς ξαναποκτούν την ευλυγισία τους - με δύο λόγια το σώμα πραγματικά ξανανιώνει.

Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες σταφυλιού με χρώμα κόκκινο, κίτρινο και μαύρο (σκούρο κόκκινο). Όλες οι ποικιλίες είναι εξίσου ωφέλιμες γιατί είναι πλούσιο σε βιταμίνες A, B και C και κάλιο και αποδίδει 60 θερμίδες στα 100gr που αντιστοιχούν σε ποσότητα ίση με 10-12 ρόγες.

Η κατανάλωση σταφυλιών συντελεί στη διούρηση και την αποβολή τοξινών λόγω της περιεκτικότητας τους σε κάλιο. Εξάλλου λόγω των αποτοξινωτικών ιδιοτήτων του σταφυλιού προέκυψε ο όρος σταφυλοθεραπεία που περιλαμβάνει την κατανάλωση μόνο σταφυλιού για μερικές μέρες, κάτι που στην αρχαία Ελλάδα ήταν ιδιαίτερα σύνηθες. Στη σύγχρονη εποχή, το επιστημονικό ενδιαφέρον για τα σταφύλια οφείλεται στο 'γαλλικό παράδοξο' που αφορά τη μειωμένη συχνότητα καρδιοπαθειών στους Γάλλους παρά το ότι καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε λιπαρά. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στις αυξημένες ποσότητες κρασιού που καταναλώνουν οι Γάλλοι (Renaud και de Lorgeril 1992).



Αν και τα τελευταία 30-40 χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη χημική σύσταση των σταφυλιών και του κρασιού, ωστόσο δεν είναι πλήρως γνωστή. Περισσότερες από 500 χημικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί από τις οποίες οι 150 περίπου είναι εστέρες. Μεταξύ αυτών των ενώσεων περιλαμβάνονται το νερό (η συγκέντρωση του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών), σάκχαρα (με κυριότερα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ενώ η σουκρόζη συναντάται σπανιότερα), οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται σε συγκεντρώσεις  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  mg/lit ενώ υπάρχουν

ορισμένες σε συγκέντρωση >100mg/lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson 1993).

Για παράδειγμα, η πολυφαινολική ουσία ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στη φλούδα των σταφυλιών έχει αντικαρκινική δράση, μειώνει την σύνθεση των ελεύθερων ριζών, τον κίνδυνο φλεγμονής και την συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων. Επίσης μελέτες δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη που βρίσκεται και στα μούρα, το πεύκο, τα φιστίκια και τα φασόλια έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τις βιταμίνες C και E και μειώνει τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης. Την ίδια επίδραση έχουν και οι ουσίες τανίνη και κερκετίνη που επίσης βρίσκονται στα σταφύλια. Ένα αυξανόμενο σώμα των στοιχείων της έρευνας δείχνουν ότι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες από σταφύλια, συμπεριλαμβανομένων των κόκκινο κρασί, βοηθά στη μείωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων.

Έχει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες σταφυλιού παίζουν σημαντικό ρόλο με πολλούς διαφορετικούς τρόπους για την πρόληψη καρδιαγγειακών και άλλων «φλεγμονωδών» ασθενειών. Οι πολυφαινόλες είναι φυσικά αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα σταφύλια και κάποιες άλλες φυτικές τροφές. Ο τύπος και οι δράσεις τους ποικίλλουν ανάλογα με το πού βρίσκονται στο σταφύλι. Οι σπόροι σταφυλιού, η φλούδα του και ο χυμός του σταφυλιού περιέχουν διάφορα είδη των πολυφαινολών, συμπεριλαμβανομένων της ρεσβερατρόλης, των φαινολικών οξέων, τις ανθοκυανινών και των φλαβονοειδών. Μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης τους, οι πολυφαινόλες του σταφυλιού βοηθούν στο να επιβραδυνθεί ή να εμποδιστεί η κυτταρική βλάβη που προκαλείται από την οξείδωση. Οι πολυφαινόλες μειώνουν την οξείδωση της χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Day et al., 1997), ένα βασικό στάδιο για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Οι πολυφαινόλες έχουν επίσης και άλλες προστατευτικές επιδράσεις στην καρδιά και τα αγγεία, συμπεριλαμβανομένων δράσεων για τη μείωση της πηκτικότητας του αίματος, προστασίας από ανωμαλίες στον καρδιακό ρυθμό, και την στένωση των αγγείων (Chou et al., 2001).

Μέχρι στιγμής, τα περισσότερα από τα αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με πολυφαινόλες σταφυλιού προέρχεται από εργαστηριακά πειράματα και μελέτες σε ζώα. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με εκχυλίσματα σταφυλιών σπόρους και έδειξαν βελτίωση της ροής του αίματος και μείωσης των

επιπέδων της χοληστερόλης. Σε άλλες μελέτες, η κατανάλωση Concord (χυμός σταφυλιών) έχει βελτιώσει τη ροή του αίματος σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και μείωσε την αρτηριακή πίεση σε ασθενείς με υπέρταση.

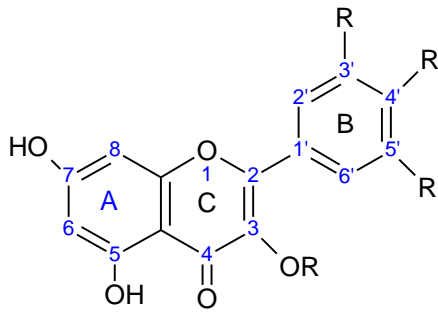
## **2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη οικογένεια φυσικών ενώσεων που υπάρχουν ευρέως στις φυτικές τροφές. Πολυφαινόλες που υπάρχουν στο πράσινο τσάι και εκείνες του οίνου, έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον. Σημαντικές πηγές πολυφαινολικών ενώσεων στις δυτικές κοινωνίες είναι τα κρεμμύδια (φλαβονόλες), το Cacao (προανθοκυανιδίνες), το τσάι, τα μήλα, το κόκκινο κρασί (φλαβονόλες και κατεχίνες), των εσπεριδοειδών (φλαβονόνες), των μούρων, των κερασιών (ανθοκυανίνες) και της σόγιας (ισοφλαβόνες).

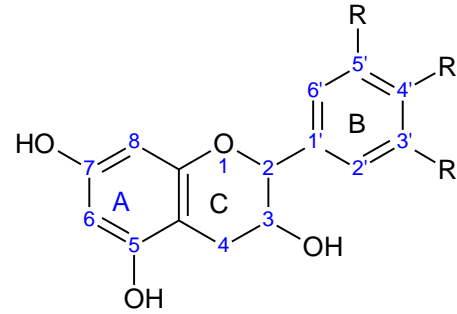
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Έτσι οι πολυφαινόλες διακρίνονται στα *φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες* (Manach et al., 2004).



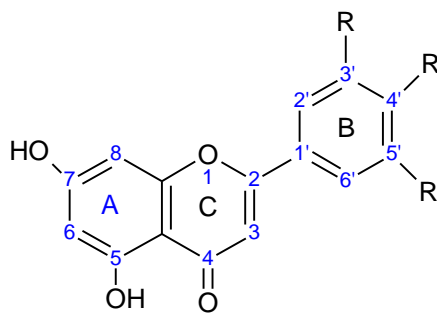
Φλαβονόλες



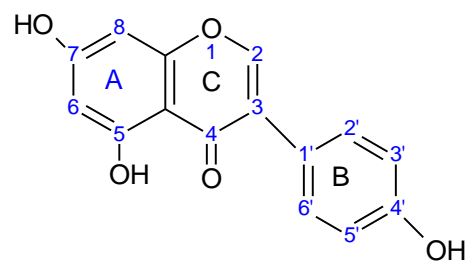
Φλαβανόλες



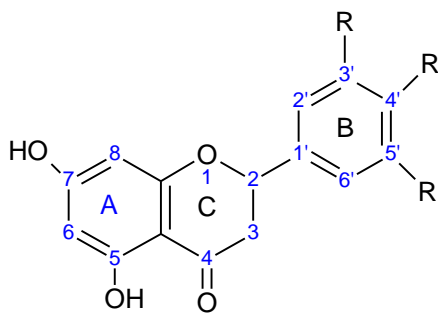
Φλαβόνες



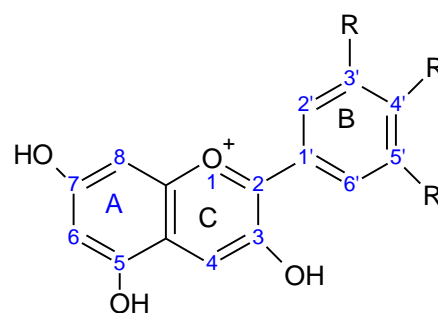
Ισοφλαβόνες



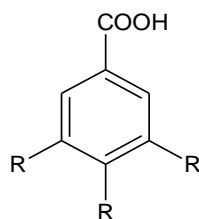
Φλαβανόνες



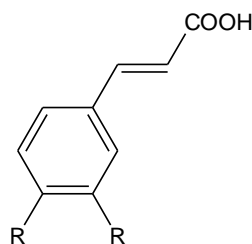
Ανθοκυανιδίνες



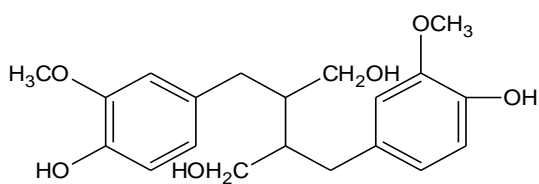
Εικόνα: Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.



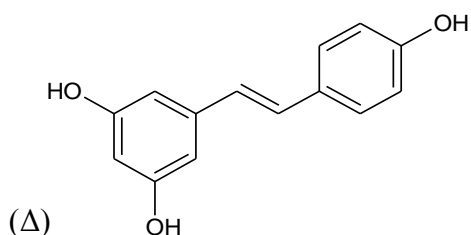
(A)



(B)



(Γ)



(Δ)

**Εικόνα:** Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (A) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (B) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολαρισρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων.

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις *φλαβονόλες* (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπερόλη και μυρικετίνη), τις *φλαβόνες* (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις

ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). Τα φλαβονοειδή μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Σημαντική κατηγορία πολυμερών είναι οι προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες που προκύπτουν από πολυμερισμό των φλαβανολών με τους γαλλικούς εστέρες τους με δεσμούς μεταξύ του C4 και του C6 ή C8. Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Lea et al., 1979; Soleas et al., 1997; Ferguson 2001; Cook και Samman 1996). Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004). Οι φλαβόνες βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή) και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi και Nacz 1995). Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Tomas-Barberan και Clifford 2000). Τα ισοφλαβονοειδή βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια, με τη σόγια και τα προϊόντα της να είναι οι κυριότερες πηγές. Χαρακτηριστικό των ισοφλαβονοειδών είναι ότι αν και δεν είναι στεροειδή, η δομή τους παρουσιάζει ομοιότητες με των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδέονται με υποδοχείς οιστρογόνων και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα (Cassidy et al., 2000). Οι φλαβανόλες, είτε ως μονομερή (κατεχίνες) είτε ως πολυμερή (προκυανιδίνες), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερύκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (π.χ. στο λάχανο, στα φασόλια, στη μελιτζάνα) αλλά είναι περισσότερο άφθονα στα φρούτα (Clifford 2000).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών.

Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκιναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με την εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Clifford και Scalbert 2000). Τα υδροξυκιναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκιναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Clifford 1999). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκιναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Lempereur et al., 1997). Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al., 1998). Είναι μια από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997).

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ άλλα δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητές τους (Adlercreutz και Mazur 1997).

### 3. ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

#### 3α. Γενικά

Προέλευση της λέξης Καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως «πατέρας της ιατρικής». Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε τους όρους «καρκίνος» και «καρκίνωμα» για να περιγράψει διάφορους όγκους που εμφάνιζαν εσωτερικά ή εξωτερικά έλκη και διογκώσεις. Στην Ελληνική γλώσσα οι λέξεις αυτές αναφέρονται στα καβούρια, τα οποία θυμίζουν τον καρκίνο, αφού οι ακτινωτές μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων, φέρνουν αμυδρά στο μυαλό τη μορφή που έχουν τα πόδια και οι δαγκάνες του καβουριού. Ο καρκίνος (όγκος) είναι η ανώμαλη ανάπτυξη κύτταρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων σε διάφορα σημεία του σώματος. Η ανώμαλη αυτή λειτουργία δεν πρέπει να συγχέεται με δυο φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού:

- Την αναγέννηση των ιστών που συμβαίνει όταν αφαιρείται ιστός και ο οργανισμός ξανά φτιάχνει τον ίδιο ιστό. Για παράδειγμα, στην καταστροφή των ηπατικών κυττάρων (αφαίρεση ήπατος ) το ήπαρ αναγεννάται σε 6 μήνες.
- Την υπερπλασία που συμβαίνει λόγω της ανάγκης του οργανισμού να αναπτύσσει φυσιολογικούς ιστούς (π.χ υπερπλασία του ενός νεφρού όταν υπάρχει έλλειψη του άλλου).

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται μία ομάδα νοσημάτων, που η αιτία τους βρίσκεται σε κυτταρικό επίπεδο. Ο όρος αναφέρεται στην υπερβολική, χωρίς προγραμματισμό, ανάπτυξη κυττάρων του οργανισμού, που ήταν φυσιολογικά, μέχρι τη στιγμή της έναρξης της διαδικασίας καρκινογένεσης. Οργανικά, ο καρκίνος είναι μία ασθένεια των κυττάρων. Συνεπώς, η κατανόηση του καρκίνου προϋποθέτει μία μικρή αναφορά σχετικά με το τι συμβαίνει όταν φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά.

Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από κύτταρα. Φυσιολογικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται, ώστε να προκύψουν θυγατρικά κύτταρα και να διατηρηθεί η υγεία του οργανισμού. Μερικές φορές, η διαδικασία αυτή εκτρέπεται από το φυσιολογικό, οπότε προκύπτουν νέα κύτταρα (χωρίς να τα χρειάζεται ο οργανισμός) και - παράλληλα - δεν πεθαίνουν τα παλιά κύτταρα. Τα πλεονάζοντα κύτταρα σχηματίζουν μάζες, που καλούνται όγκοι. Σε μερικές περιπτώσεις αυτά τα παθολογικά κύτταρα κάνουν μετάσταση, δηλαδή εξαπλώνονται και σε άλλα μέρη του σώματος δημιουργώντας δευτερεύοντες όγκους (μεταστατικούς όγκους) παρόμοιους με αυτούς του αρχικού καρκίνου.

Ο καρκίνος συνήθως δεν επηρεάζει μόνο ένα όργανο του σώματος και δεν έχει μία μορφή. Μπορεί να περιλαμβάνει οποιοδήποτε ιστό του σώματος και να έχει τελείως διαφορετική μορφή σε κάθε σημείο του σώματος. Υπάρχουν πάνω από 200 διαφορετικά είδη καρκίνου και δεν αντιμετωπίζονται όλοι με τον ίδιο τρόπο. Κάθε ένα είδος έχει τον δικό του τρόπο θεραπευτικής αντιμετώπισης. Οι περισσότερες μορφές καρκίνου είναι στην ουσία όγκοι εκτός από ορισμένους τύπους καρκίνου όπως η λευχαιμία, των οποίων τα κύτταρα κυκλοφορούν μέσα στο αίμα και στα όργανα και τελικά αναπτύσσονται σε συγκεκριμένους ιστούς.

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα κύτταρα στο σώμα μας αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Στα πρώτα χρόνια της ζωής, και μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου, ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι έντονος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαιρούνται μόνο για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν φθαρεί ή πεθάνει.

Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα, διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, που ονομάζεται όγκος. Οι όγκοι είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Γενικά, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα.

Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε

άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση. Οι καρκίνοι του αίματος ονομάζονται λευχαιμίες. Τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται στο άτομο εξαρτώνται από το μέγεθος του όγκου, από τη θέση του στο σώμα, από το στάδιο ανάπτυξής του, από το αν έχει εισβάλει στους γειτονικούς ιστούς και σε ποια έκταση και από το αν έχει υπάρξει μετάσταση. Κάθε καρκίνος (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα, της μήτρας, του προστάτη κτλ.) έχει διαφορετικά συμπτώματα, διαφορετική εξέλιξη και επομένως αποτελεί διαφορετική ασθένεια.

### 3β. Καρκίνος του ήπατος

Πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), είναι ένας από τις πιο συχνούς όγκους που αντιπροσωπεύει την πιο συχνή κακοήθεια σε όλο τον κόσμο και η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο (Parkin 2001). Σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν σε HCC είναι οι χρόνιες μολύνσεις από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) ή της ηπατίτιδας C (HCV), η παρατεταμένη έκθεση σε μερικούς διατροφικούς καρκινογόνους παράγοντες, ιδίως σε αφλατοξίνη (Bosch 1999; Pang 2006), ο αλκοολισμός και, ενδεχομένως, η παχυσαρκία (Neuschwander-Tetri 2003) και ο διαβήτης (El-Serag 2004). Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν κίρρωση διαφόρων αιτιολογιών όπως αλκοολική κίρρωση και κίρρωση που συνδέονται με γενετικές ασθένειες του ήπατος και πρωτογενή αιμοχρωμάτωση (Pang 2006; El-Serag 2001). Έτσι, ο HCC εκδηλώνεται σε περιοχές με υψηλή συχνότητα εμφάνισης του HBV (π.χ. Νοτιοανατολική Ασία και την υπο-σαχάρια Αφρική) και HCV (π.χ. Νότια Ευρώπη) (Nordenstedt 2010). Στη Βόρεια Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες πρωταρχική αιτία του HCC είναι η αλκοολική ηπατοπάθεια και ο HCV (El-Serag 2001; Bosch 2005; Mischiesen 2005). Θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με HCC περιλαμβάνουν την χειρουργική εκτομή (Takayama 1998) και τη μεταμόσχευση ήπατος οι οποίες ισχύουν μόνο για ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με πρώιμους όγκους (Poon 2004). Άλλες θεραπείες για HCC είναι η διαδερμική έγχυση αιθανόλης (Ebara 1990), η διαδερμική καυτηρίαση με ραδιοσυχνότητες (Curley 2000) και με καθετήρα αρτηριακό εμβολισμό (Ikeda 1991) αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για ανακούφιση (Poon 2002). Όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, μέχρι στιγμής, το μόνο φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του HCC είναι το sorafenib, αλλά το κέρδος για επιβίωση είναι μέτριο (Horgan 2010). Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους οι ασθενείς με HCC έχουν κακή πρόγνωση είναι η πολυκεντρική εμφάνιση του HCC στο ήπαρ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα ή η

κίρρωση που προκαλείται κυρίως από λοίμωξη HBV ή HCV (Yamamoto 1999). Έτσι, ακόμη και αν ο πρώτος καρκίνος διαγνωστεί και απομακρυνθεί, ένας άλλος παθολογικός κυτταρικός κλώνος μπορεί να προκύψει για να σχηματίσουν ένα δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο (Moriwaki 2002). Επιπλέον, μπορεί να υπάρξει υποτροπιασμός σε ασθενείς με HCC που οφείλεται σε ενδοηπατική μετάσταση, δηλαδή την εμφάνιση ενός κυτταρικού κλώνου που προέρχεται από τη μετατροπή αρχικού κλώνου κυττάρων (Chen 2000). Η συχνότητα αυτού του περιοδικού καρκίνου του ήπατος εκτιμάται ότι είναι κατά 20-25% ετησίως. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος για την θλιβερή πρόγνωση του HCC είναι η επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας του HCC (Nagasue 1999; Eguchi 2000). Ως εκ τούτου, λόγω του γεγονότος ότι οι τρέχουσες θεραπείες για HCC δεν είναι τόσο αποτελεσματικές, χρειάζονται νέες στρατηγικές για να εμποδίσουν την ανάπτυξη ή την μετά-θεραπευτική επανάληψη του HCC, αλλά και να μην συνεισφέρουν σε τυχόν επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας.

Η θεραπευτική τακτική εξαρτάται από το στάδιο της νόσου (δηλαδή την έκτασή της), τη βιολογική ηλικία (όχι την πραγματική αλλά την ποιότητα της υγείας για τη δεδομένη ηλικία), την κατάσταση του ήπατος (πόσο καλά λειτουργεί) και τη γενική κατάσταση του ασθενούς. Ο γιατρός, ο οποίος πρέπει να είναι εξειδικευμένος στο συγκεκριμένο αντικείμενο, μπορεί να συστήσει χειρουργική θεραπεία, χημειοθεραπεία (συστηματική, δηλαδή με ενδοφλέβια χρήση φαρμάκων που διαχέονται σε όλο το σώμα ή περιοχική, δηλαδή με χορήγηση φαρμάκων με ειδικό σύστημα από την ηπατική αρτηρία που εγχέονται απευθείας μόνο στο ήπαρ σε συνδυασμό ή όχι με εμβολισμό) ή ακτινοβολία και βιολογική θεραπεία (που ενισχύει τον οργανισμό στην καταπολέμηση της νόσου με τις ίδιες τις δυνάμεις του-αυτή λέγεται και ανοσοθεραπεία). Ο γιατρός μπορεί να συστήσει επίσης το συνδυασμό δύο ή περισσότερων από τις παραπάνω θεραπευτικές δυνατότητες. Γενικώς, ο καρκίνος του ήπατος αντιμετωπίζεται δύσκολα εκτός και εάν ο όγκος είναι σχετικά μικρός και εντοπίζεται στον ένα λοβό του ήπατος αλλά, στις πιο πολλές περιπτώσεις, η διάγνωση της νόσου γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, όταν ο καρκίνος είναι ανεγχείρητος. Η χειρουργική θεραπεία, όταν ενδείκνυται, αποτελεί τη μόνη και πιο αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή που μπορεί να προσφέρει και μόνιμη θεραπεία. Η μεταμόσχευση του ήπατος εφαρμόστηκε κατά το παρελθόν αλλά αποδείχθηκε ότι συνήθως ο καρκίνος εμφανίζεται πάλι (υποτροπή) και σήμερα δεν συνιστάται. Όταν, η χειρουργική θεραπεία, όπως συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν έχει θέση



στην αντιμετώπιση της νόσου, εφαρμόζοντας τις άλλες μορφές θεραπείας που είναι παρηγορικού τύπου (όχι θεραπευτικές), ο ασθενής μπορεί να ανακουφιστεί από τα συμπτώματά του και να του προσφερθεί καλύτερη ποιότητα ζωής ή και ακόμη να επιμηκυνθεί ο χρόνος επιβίωσής του.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί κάποιες στρατηγικές για να αποτρέψουν την ανάπτυξη του HCC. Μία από τις πιο αποτελεσματικές στρατηγικές πρόληψης του καρκίνου του ήπατος στον γενικό πληθυσμό είναι ο εμβολιασμός κατά της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας. Για παράδειγμα, ο εμβολιασμός κατά του HBV μείωσε σημαντικά τη συχνότητα του HCC σε παιδιά στην Ταϊβάν (Chang 1997). Ωστόσο, ο εμβολιασμός έναντι του HCV δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί, και έτσι άλλες μέθοδοι, όπως έλεγχος για HCV σε δωρεές αίματος, χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της μετάδοσης HCV μέσω μετάγγισης αίματος. Επιπλέον, η ιντερφερόνη έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ήπατος με την εξάλειψη του HCV από ασθενείς με χρόνιες παθήσεις του ήπατος (Kasahara 1998; Camma 2001). Άλλες στρατηγικές πρόληψης ενάντια στον HCC είναι η μείωση της έκθεσης στην αφλατοξίνη. Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη *Aspergillus*, και βρέθηκαν σε τρόφιμα, όπως καλαμπόκι και φρούτα, ιδιαίτερα υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας. Στις περιοχές όπου η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με αφλατοξίνη είναι κοινή, τα ποσοστά εμφάνισης HCC τείνουν να είναι υψηλά (Nordenstedt 2010). Η έκθεση σε αφλατοξίνη μπορεί να μειωθεί με τη χρήση καλύτερων μεθόδων για την συγκομιδή, αποθήκευση και επεξεργασία ευαίσθητων τροφίμων. Ωστόσο, η πλήρης εξάλειψη της μόλυνσης από αφλατοξίνες δεν θεωρείται πιθανή. Οι παραπάνω στρατηγικές πρόληψης ανήκουν στην πρωτογενή πρόληψη με στόχο τον γενικό πληθυσμό ή άτομα με αυξημένο κίνδυνο για HCC. Για τη δευτερογενή πρόληψη κατά του HCC, η οποία στοχεύει κυρίως σε ασθενείς είτε με προ-κακοήθεις αλλοιώσεις ή με υποτροπιάζοντες όγκους αλλά που είχαν λάβει θεραπεία κατά του καρκίνου για τον αρχικό όγκο, η χημειοπροφύλαξη μπορεί να είναι η πιο σημαντική στρατηγική. Χημειοπροφύλαξη ορίζεται ως η χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων για την αναστροφή, καταστολή ή την πρόληψη καρκινικής ανάπτυξης σε καρκίνο (Sporn and Liby 2005). Πολλοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες είναι φυτοχημικές ουσίες, δηλαδή μη θρεπτικές χημικές ουσίες των φυτών που έχουν προστατευτικές ή ιδιότητες πρόληψης ασθενειών.

#### **4. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

Χημειοπροφύλαξη σημαίνει πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου μέσω της χορήγησης βιοδραστικών μη θρεπτικών συστατικών των φυτικών τροφών (τα οποία ονομάζονται φυτοχημικά συστατικά) είτε ως μέρος της διατροφής είτε ακόμα με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής (Sporn 1976). Το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως στην έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, κάπνισμα και διατροφή έτσι η χημειοπροφύλαξη θεωρείται μία από τις σημαντικότερες στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου (Morse και Stoner 1993). Σύμφωνα με τον Wattenberg (1985) οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την πρώτη φάση (initiation) της καρκινογενετικής διαδικασίας.
3. Παράγοντες καταστολής ή και παρεμπόδισης της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Οι παράγοντες αυτοί αναστέλλουν την προαγωγική (promotion) και την προοδευτική (progression) φάση της καρκινογένεσης.

##### 1. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου συνήθως αναστέλλουν το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ), σουλφυδρυλικές ενώσεις (π.χ. N-ακετυλοκυστεΐνη) και διάφορα αμινοξέα (π.χ. προλίνη, θειοπρολίνη). Για παράδειγμα, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ελαττώνει το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981; Hartman και Shankel 1990; Κουρέτας 2003).

##### 2. Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: i) αναστολείς του κυτοχρώματος P-450, ii) επαγωγείς των ενζύμων

της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, iii) εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών, iv) επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA (Κουρέτας 2003).

Το κυτόχρωμα P-450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που βρίσκονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων αλλά και άλλων κυττάρων, τα οποία παίζουν τον κύριο ρόλο στη φάση I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι αντιδράσεις της φάσης I μερικές φορές οδηγούν στη μετατροπή προ-καρκινογόνων ουσιών σε καρκινογόνες. Έτσι έχει βρεθεί ότι ουσίες που αναστέλλουν τη δράση του κυτοχρώματος P-450, όπως το ισοθειοκυανικό φαιλυλεξόλιο, εμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων στους πνεύμονες ποντικών (Morse et al, 1991). Οι αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών. Συνεπώς, ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης ή GST) πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσιών. Για παράδειγμα, ένα ισοθειοκυανικό παράγωγο που βρίσκεται στα μπρόκολα, είναι πιθανός επαγωγέας της GST και αναστέλλει τη χημικά προκαλούμενη ανάπτυξη των όγκων σε αρουραίους (Zhang et al., 1992).

Τα περισσότερα καρκινογόνα μεταβολίζονται σε δραστικές ηλεκτρονιόφιλες μορφές που αντιδρούν με το DNA σχηματίζοντας ομοιοπολικές ενώσεις (DNA adducts), οι οποίες οδηγούν σε μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του DNA και ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Κατά συνέπεια, η εξουδετέρωση των ηλεκτρονιόφιλων καρκινογόνων ουσιών θεωρείται βασικός μηχανισμός χημειοπροφύλαξης. Για παράδειγμα, μία φυτική πολυφαινόλη, το ελλαγικό οξύ, αντιδρά ομοιοπολικά με το διολεποξειδίο του βενζοπυρενίου και το απενεργοποιεί προστατεύοντας πειραματόζωα από καρκινογένεση (Sayer et al., 1982).

Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ορισμένα χημικά καρκινογόνα ελαττώνουν τα επίπεδα ενζύμων, όπως την πολύ(ADP-ριβοσυλ)-τρανσφεράση (ADPRT), που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Έχει βρεθεί ότι η Ν-ακετυλοκυστεΐνη αποτρέπει την ελάττωση των επιπέδων του ενζύμου ADPRT, που προκαλείται από το χημικό καρκινογόνο 2-ακετυλο-αμινο-φλουορένιο (AAF).

### 3. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης

Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτής της κατηγορίας μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών,
- επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης,
- ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways),
- ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων,
- αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων,
- επαγωγείς της κυτταρικής επικοινωνίας,
- επαγωγείς της απόπτωσης,
- ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA,
- αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης,
- επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης και
- αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (De Flora και Ramel 1990)..

Η συγκέντρωση των πολυαμινών στα κύτταρα σχετίζεται με την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και συχνά με μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Ένα ένζυμο κλειδί στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυαμινών είναι η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) που καταλύει τη μετατροπή της ορνιθίνης σε πουτρεσκίνη. Τα επίπεδα της ODC και των πολυαμινών είναι συχνά αυξημένα στους καρκινικούς ιστούς. Διάφοροι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες φαίνεται να δρουν μέσω αναστολής της ODC, όπως το ελλαγικό οξύ και οι φυτικές πολυφαινόλες που βρίσκονται στο τσάι (Κουρέτας 2003).

Χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ότι έχουν χάσει την ικανότητα να διαφοροποιούνται. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang et al., 1986; Sani et al., 1990).

Τα μόρια των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελούν στόχους χημειοπροφύλαξης με αποτέλεσμα τη φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για παράδειγμα, μία κατηγορία φυτικών πολυφαινολών, τα

φλαβονοειδή, αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) οδηγώντας σε καταστολή της καρκινογένεσης (Kelloff et al., 1997).

Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορεί να δρουν άμεσα αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της δραστικότητας ορμονών ή αυξητικών παραγόντων. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να γίνει σε επίπεδο υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (όσον αφορά αυξητικούς παράγοντες και πεπτιδικές ορμόνες) ή σε επίπεδο κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποδοχέων (όσον αφορά τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών). Για παράδειγμα τα αντιστρογόνα, όπως η ταμοξιφένη, συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας τη σύνδεση και τη δράση των οιστρογόνων, τα οποία εμφανίζουν δράση προαγωγέα σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan 1992).

Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν την ικανότητα των χημειοπροφυλακτικών ουσιών να αναστέλλουν τη δράση των ογκογονιδίων εστιάζονται στο ογκογονίδιο ras. Για να ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη ras, θα πρέπει πρώτα να υποστεί φαρνεσυλίωση. Έχει λοιπόν βρεθεί ότι η ουσία D-λιμονίνη, που βρίσκεται στα κίτρα, αναστέλλει τη φάση προόδου των όγκων του μαστού σε αρουραίους στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson et al., 1988).

Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των χασμοσυνδέσμων (gap junctions) κυτταρικής επικοινωνίας. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω των οποίων τα κύτταρα επικοινωνούν με τα γειτονικά κύτταρα. Πιστεύεται ότι στην καρκινογενετική διαδικασία αναστέλλεται αυτή η κυτταρική επικοινωνία. Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες όπως το β-καροτένιο, το ρετινοϊκό οξύ και η βιταμίνη A προάγουν την επικοινωνία των κυττάρων μέσω των χασμοσυνδέσμων αναστέλλοντας την μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά (Zhang et al., 1991; Κουρέτας 2003)..

Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί σημαντική παράμετρο ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Διάφορες καρκινογόνες ουσίες με μιτογόνο δράση αναστέλλουν την απόπτωση (Bursch et al., 1992). Έχει αποδειχτεί ότι αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επάγουν την απόπτωση, όπως η ταμοξιφένη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Bursch et al., 1992) ή η σουλινδάκη, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, που αναστέλλει την

ανάπτυξη πολυπόδων στο παχύ έντερο (Labayle et al., 1991). Έχει αποδειχτεί ότι η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Wainfan και Poirier 1992). Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν σαν δότες μεθυλικών ομάδων. Για παράδειγμα, η μεθειονίνη που συμμετέχει μαζί με το φολικό οξύ και τη βιταμίνη B12 στη ρύθμιση του ενδοκυττάρου μεταβολισμού του μεθυλίου, αναστέλλει τους χημικά προκαλούμενους όγκους του μαστού σε αρουραίους (Wainfan και Dizik 1987).

Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν διάφορα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη λύση της βασικής μεμβράνης, με συνέπεια τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Τέτοια ένζυμα είναι οι πρωτεάσες (π.χ. η κολλαγενάση, η υαλουρονιδάση, η καθεψίνη D, και η ελαστάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Έτσι, η χημειοπροφυλακτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών, τουλάχιστον εν μέρει, οφείλεται στην αναστολή της λύσης της βασικής μεμβράνης (Kennedy 1998).

Αρκετοί χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω διάφορων μηχανισμών. Για παράδειγμα, το ρετινοϊκό οξύ αυξάνει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων, ενώ φαρμακολογικές δόσεις της βιταμίνης E αυξάνουν την παραγωγή αντισωμάτων (Hill και Grubbs 1992).

Κατά την καρκινογένεση παρατηρείται αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, που συμμετέχει στην παρατηρούμενη φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας 2003). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας δημιουργούνται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Μελέτες έχουν δείξει ότι αναστολείς των κυκλοοξυγενασών, όπως τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα πιροξικάμη και ινδομεθακίνη καθώς και ορισμένες φυτικές πολυφαινόλες είναι δραστικοί αναστολείς της καρκινογένεσης (Reddy et al., 1987). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι αναστολείς της λιποξυγενάσης, όπως η βιταμίνη E, αναστέλλουν την προαγωγική φάση της καρκινογένεσης σε επιδερμίδα ποντικών (Huang et al., 1991).

Σήμερα η 'χημειοπροφύλαξη' αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για την πρόληψη όχι μόνο του καρκίνου αλλά και μιας σειράς άλλων χρόνιων παθήσεων (Hong και Sporn 1997; Liu 2003). Γενικά, μία σειρά από επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση φυτικών τροφών παίζει

σημαντικό χημειοπροστατευτικό ρόλο, γιατί συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για προσβολή από ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και γενικότερα οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) (Willett 2002; Nepka et al., 1999; Huang και et al., 1994; Joseph et al., 1999; Tijburg et al., 1997). Επιπλέον τα φυτοχημικά συστατικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παρασκευή φαρμάκων καθώς σε ένα μεγάλο ποσοστό των σύγχρονων χρησιμοποιούμενων φαρμάκων οι δραστικές τους ουσίες είναι ή προέρχονται από τέτοια συστατικά (Colic και Pavelic 2000).

## **5. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν να παρατηρηθεί η επίδραση εκχυλισμάτων βόστρυχων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*vitis vinifera*) στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό καρκινικών κύτταρων ήπατος HEPG2.

## 6. ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Πίνακας. Πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων.

STEMS (mg/g extract)	Gallic acid	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Procyanidin B3	Procyanidin B2	Epicatechin gallate	trans-Caffaric acid	trans-Resveratrol	ε-Viniferin	aQ 3-O-galactoside	aQ 3-O- glucoside	aQ 3-O- rhamnoside	Quercetin	Kampferol	Caffeic acid	Syringic acid	p-Coumaric acid	Ferulic acid	TPC*	
<b>Κόκκινες ποικιλίες</b>																				
<b>B3</b>	Mandilaria Santorini 2006	31,44	65,39	4,34	26,01	5,15	3,14	4,87	12,62	20,15	8,20	2,06	0,34	1,40	0,32	0,34	0,46	0,04	0,04	584
<b>B12</b>	Mandilaria Santorini sun dried 2007	12,84	85,81	0,43	31,55	0,00	7,78	1,62	17,56	31,42	6,63	4,61	0,46	0,60	0,20	ND**	0,07	0,08	0,03	537
<b>B7</b>	Mayrotragano Santorini 2007	8,33	66,28	5,21	21,04	3,36	2,68	2,33	4,85	15,82	11,04	5,84	0,63	0,96	0,17	0,05	0,01	0,07	0,00	584
<b>B15</b>	Mayrotragano Santorini 2008	6,46	100,96	5,59	19,41	4,13	8,53	11,89	12,14	24,53	14,30	5,87	0,79	0,58	0,12	0,05	0,03	0,12	0,00	464
<b>B2</b>	Voidomato Santorini 2006	11,49	46,74	11,14	20,54	0,00	5,61	16,11	5,47	12,79	12,06	3,86	0,90	0,80	0,00	0,51	0,14	0,12	0,00	494
<b>B6</b>	Voidomato Santorini 2007	32,96	84,28	0,00	16,36	0,00	7,68	6,38	20,56	49,08	14,95	7,27	2,82	2,32	0,28	0,06	ND	0,08	0,00	367
<b>Ασπρες ποικιλίες</b>																				
<b>B5</b>	Asyrtiko Santorini 2006	22,65	75,87	1,27	31,59	2,52	4,12	4,84	6,10	15,54	13,47	4,53	0,32	2,16	0,09	0,00	0,13	0,08	0,00	451
<b>B10</b>	Asyrtiko Santorini 2007	1,78	68,85	0,00	30,02	2,48	3,25	2,15	5,13	8,54	9,09	5,15	0,71	0,19	ND	0,01	ND	0,04	0,00	574
<b>B8</b>	Asyrtiko Santorini 2008	2,27	98,29	0,00	25,79	8,55	4,46	12,25	11,42	14,53	19,22	7,16	1,53	0,32	0,04	0,00	ND	0,01	0,00	372
<b>B11</b>	Athiri Santorini 2006	8,90	36,49	2,69	20,01	2,55	4,02	0,40	3,86	8,73	4,55	3,01	0,90	0,49	0,03	0,07	0,18	0,04	0,06	559
<b>B14</b>	Athiri Santorini 20077	7,25	51,05	4,02	14,90	2,49	2,37	9,39	8,59	12,07	13,63	4,95	1,34	0,50	0,07	0,01	ND	0,01	0,00	464
<b>B9</b>	Vilana Sitia 2006	14,67	46,46	0,00	19,45	6,66	6,51	0,61	11,60	50,10	17,12	6,15	1,91	0,93	0,17	0,05	0,05	0,07	0,00	454
<b>B13</b>	Asyrtiko Santorini (Stemfyla)	22,21	47,40	12,50	5,22	21,32	12,21	0,44	0,29	1,41	4,25	4,63	1,90	3,52	0,54	0,23	0,25	0,26	0,09	167,0

a Quercetin

\* mg GAE

/Kg dm

\*\* Not Detected



## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΥΛΙΚΑ

#### 1α. Χημικά αντιδραστήρια

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

#### 1β. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

1. Θρεπτικό υλικό για κύτταρα HepG2. Οι πρώτες ύλες για το θρεπτικό υλικό είναι τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution)
- Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

<u>-Θρεπτικό υλικό με 10% FBS</u>	<u>-Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS</u>
Για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων	Για την προσθήκη των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων
200ml DMEM41966	200ml DMEM41966
20mlFBS	2ml Γλουταμίνη
2ml pen/str	2ml pen/str
2ml Γλουταμίνη	

2. Τρυψίνη

3. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco).

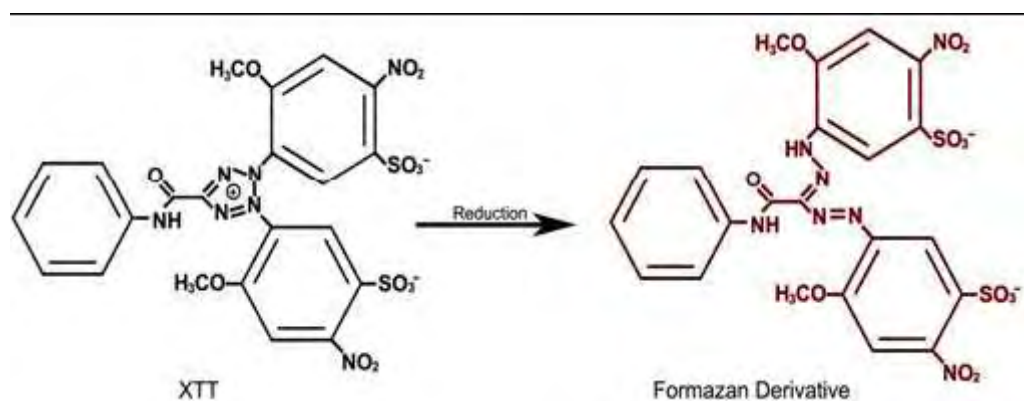
4. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2α. Μέθοδος XTT

Χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας

Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη, ως εκ τούτου, αυτή η μετατροπή εμφανίζεται μόνο σε βιώσιμα κύτταρα.. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση. Η χρωστική ουσία φορμαζάνη που σχηματίζεται λόγω της υδατοδιαλυτότητάς της ποσοτικοποιείται άμεσα με την χρήση ELISA reader. Αυτό εξασφαλίζει ένα υψηλό επίπεδο ευαισθησίας δίνοντας τη δυνατότητα μηχανογραφικής επεξεργασίας των δεδομένων και, ως εκ τούτου, επιτρέπει τον ταχύ και εύκολο χειρισμό ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση σχηματισμού του πορτοκαλί formazan παραγώγου:



### 2β. Μεθοδολογία

Μετά την αποκόλληση των HepG2 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37<sup>0</sup>C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να

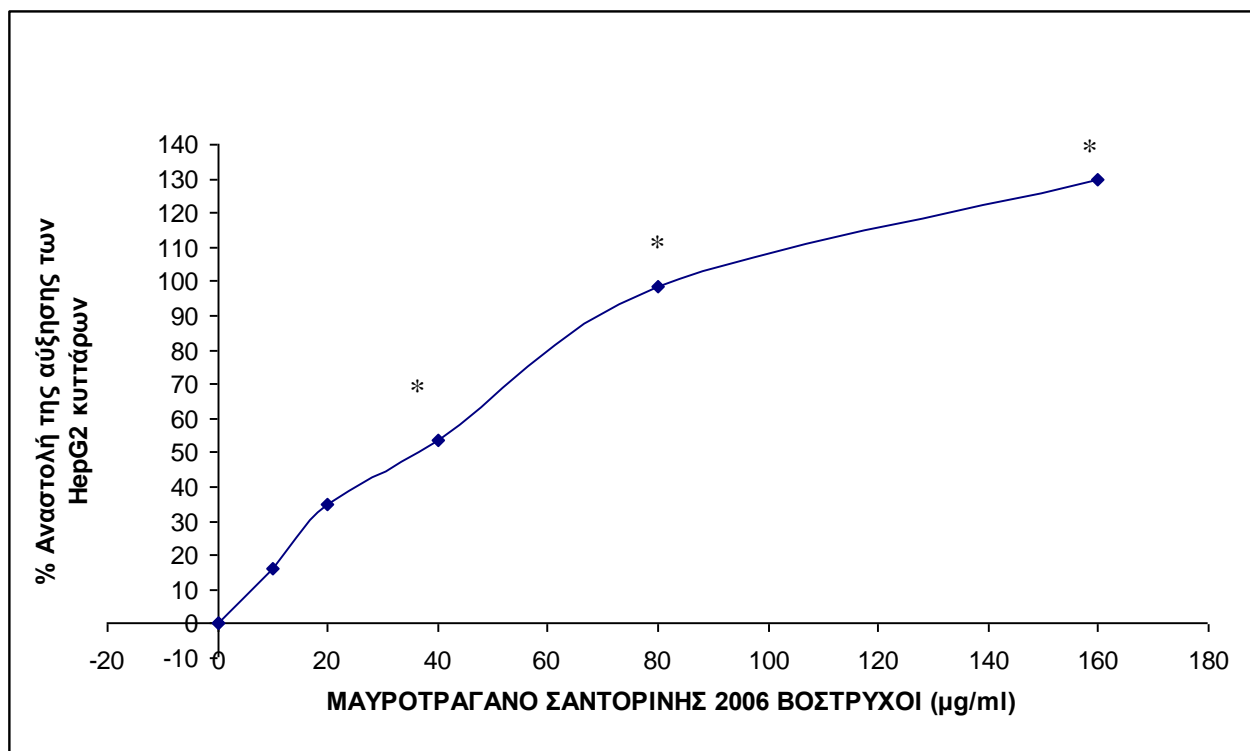
προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχύλισματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 100 μl. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτουμε 50 μl από το μίγμα XTT/reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες. (Το μίγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν μόνο ηπατικά κύτταρα και το XTT/reagent, καθώς και δείγματα μάρτυρες που περιέχουν τις εξεταζόμενες ενώσεις και XTT/reagent ώστε να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των ουσιών επηρεάζει την απορρόφηση. Μετά την επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 490 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και την χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων ουσιών στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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

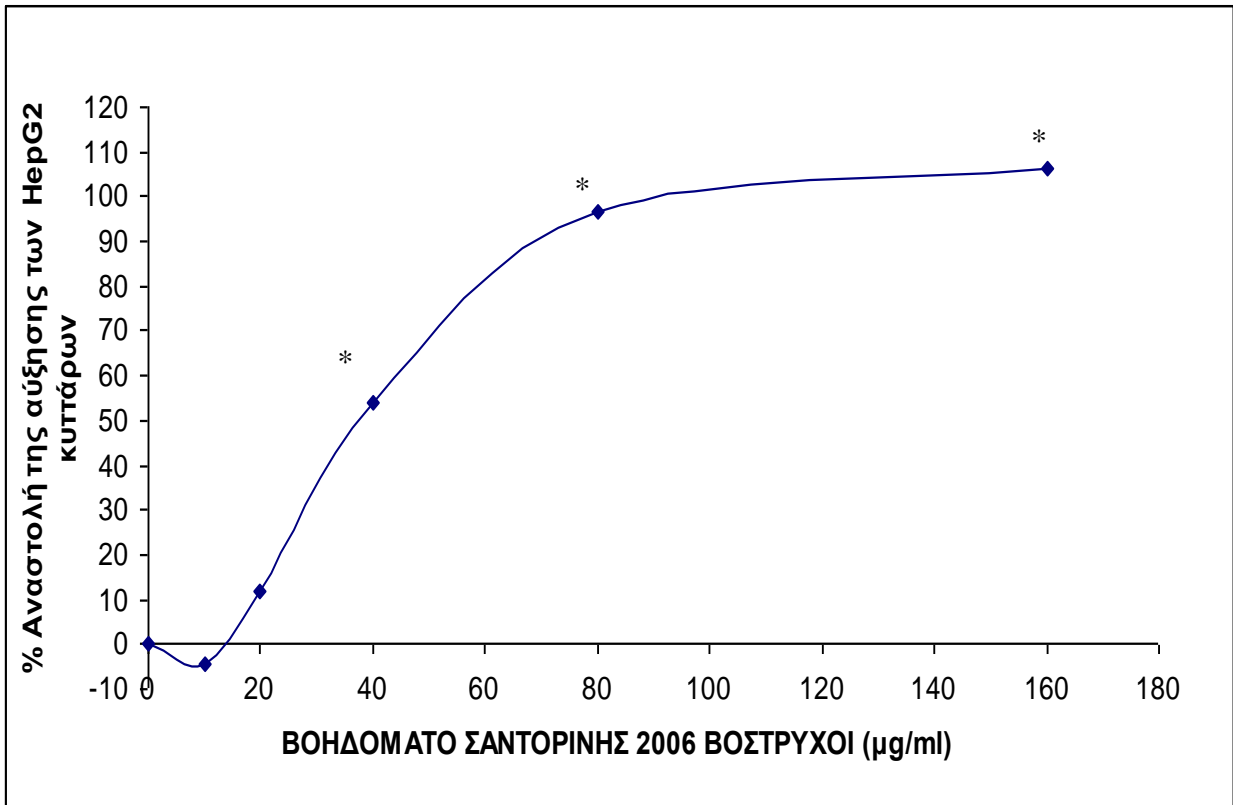
### **3.α ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Συνολικά μελετήθηκαν 22 υδατικά εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου εκ των οποίων τα 15 ήταν εκχυλίσματα βοστρύχων, τα 5 ήταν εκχυλίσματα από γίγαρτα και τα 2 εκχυλίσματα στέμφυλων. Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 σε συγκεντρώσεις των 10, 20, 40, 80, και 160μg/ml. Τα εκχυλίσματα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μείωσαν την απορρόφηση των δειγμάτων με την μέθοδο ΧΤΤ που σημαίνει ότι μείωσαν τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

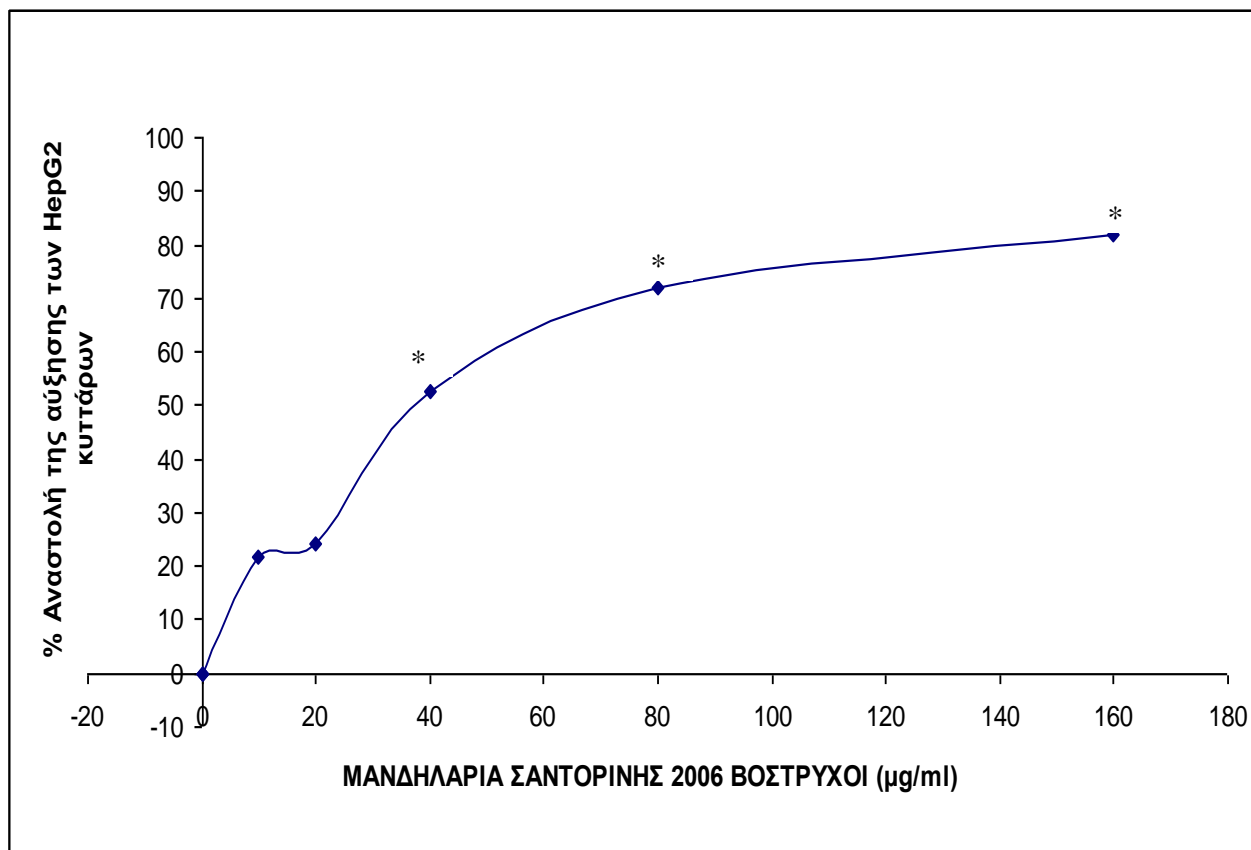
Οι τιμές IC<sub>50</sub> όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.β και είναι ενδεικτικές της ικανότητας τους να αναστέλλουν την κυτταρική αύξηση: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη η ικανότητα αναστολής του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC<sub>50</sub> κυμαίνονται από 6μg/ml έως 83μg/ml. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα ήταν από στέμφυλα και συγκεκριμένα το Μπατίκι Τυρνάβου με IC<sub>50</sub>=6μg/ml και ακολουθούν εκχυλίσματα από γίγαρτα των ποικιλιών Ασσύρτικο και Ρόμπολα με IC<sub>50</sub>=25μg/ml. Τα ισχυρότερα εκχυλίσματα βόστρυχων ήταν Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 με IC<sub>50</sub> 34μg/ml και Μαυροτράγανο Σαντορίνης με 37μg/ml. Τα ασθενέστερα εκχυλίσματα προέκυψαν από βοστρύχους της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2007 με IC<sub>50</sub>=83μg/ml και ακολουθούν τα εκχυλίσματα από γίγαρτα της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 και βοστρύχων Vinsanto Σαντορίνης 2006 με IC<sub>50</sub>=65μg/ml. Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα 16 από τα 22 δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν IC<sub>50</sub> μεταξύ των τιμών 34μg/ml και 60μg/ml.



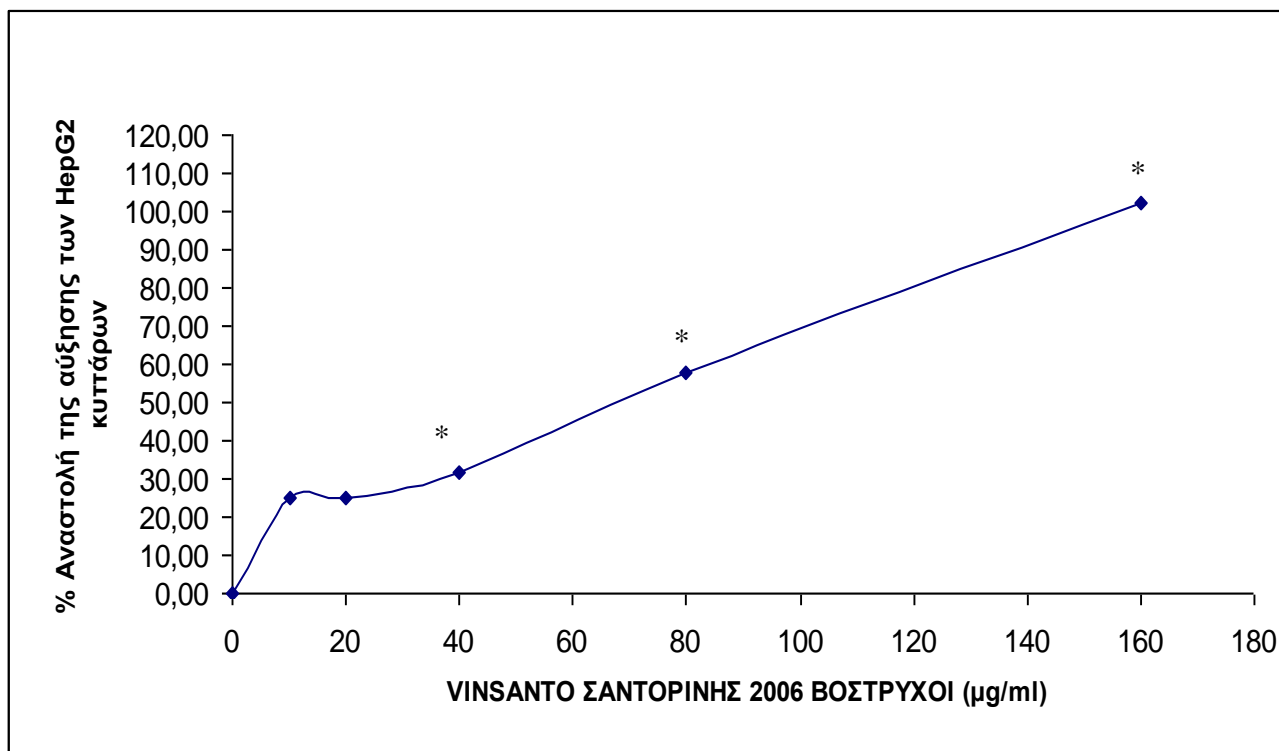
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>1.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>2.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

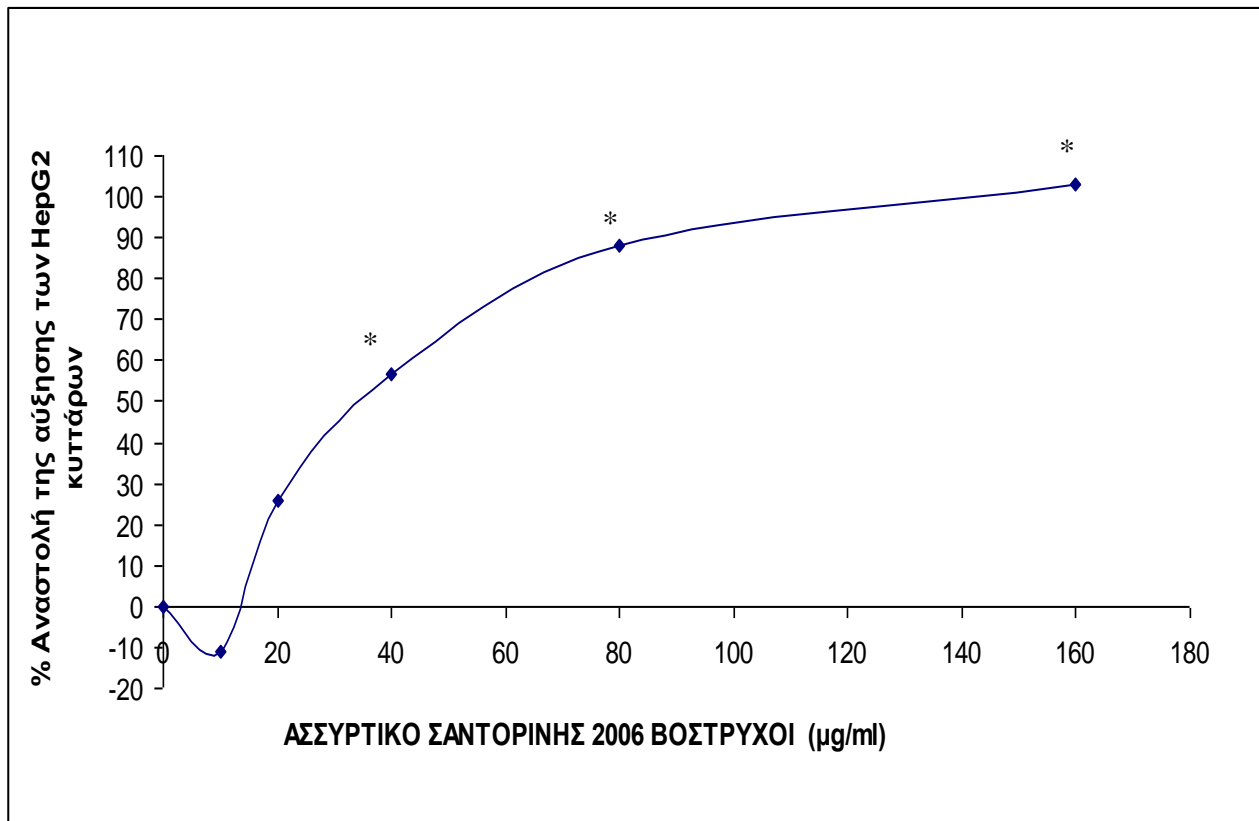


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>3.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

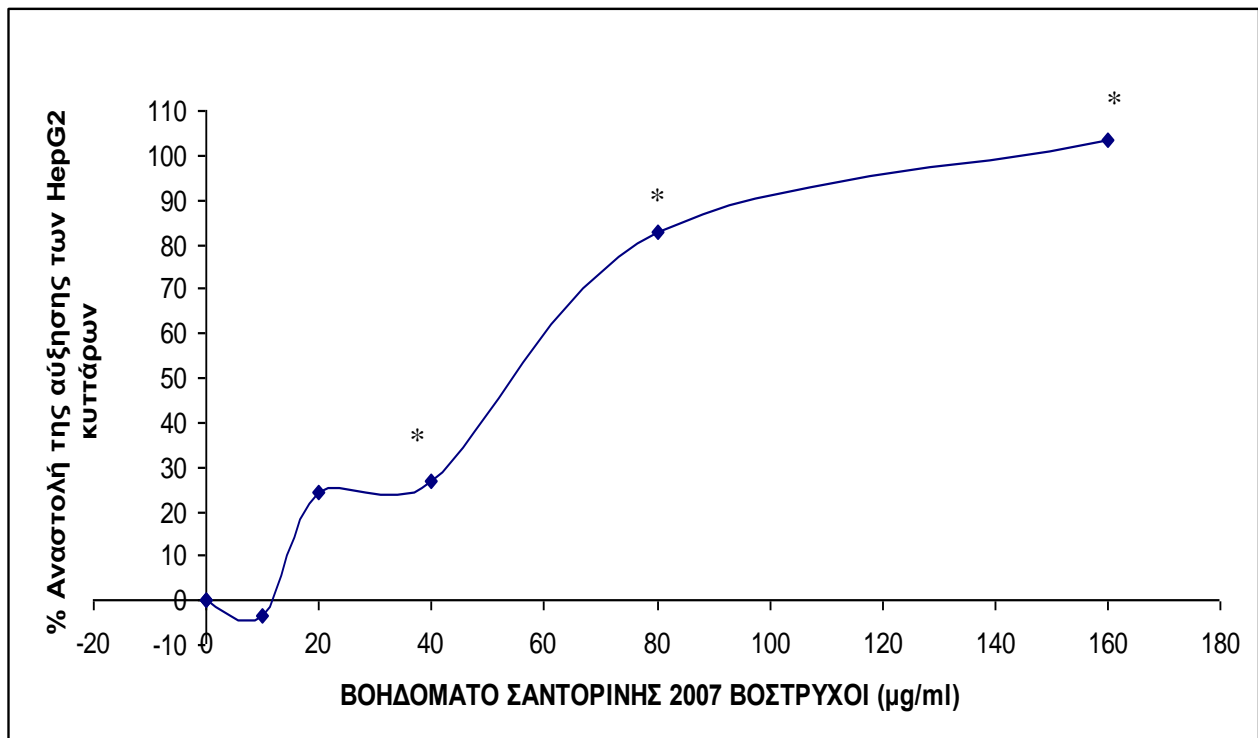


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>4.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Vinsanto Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

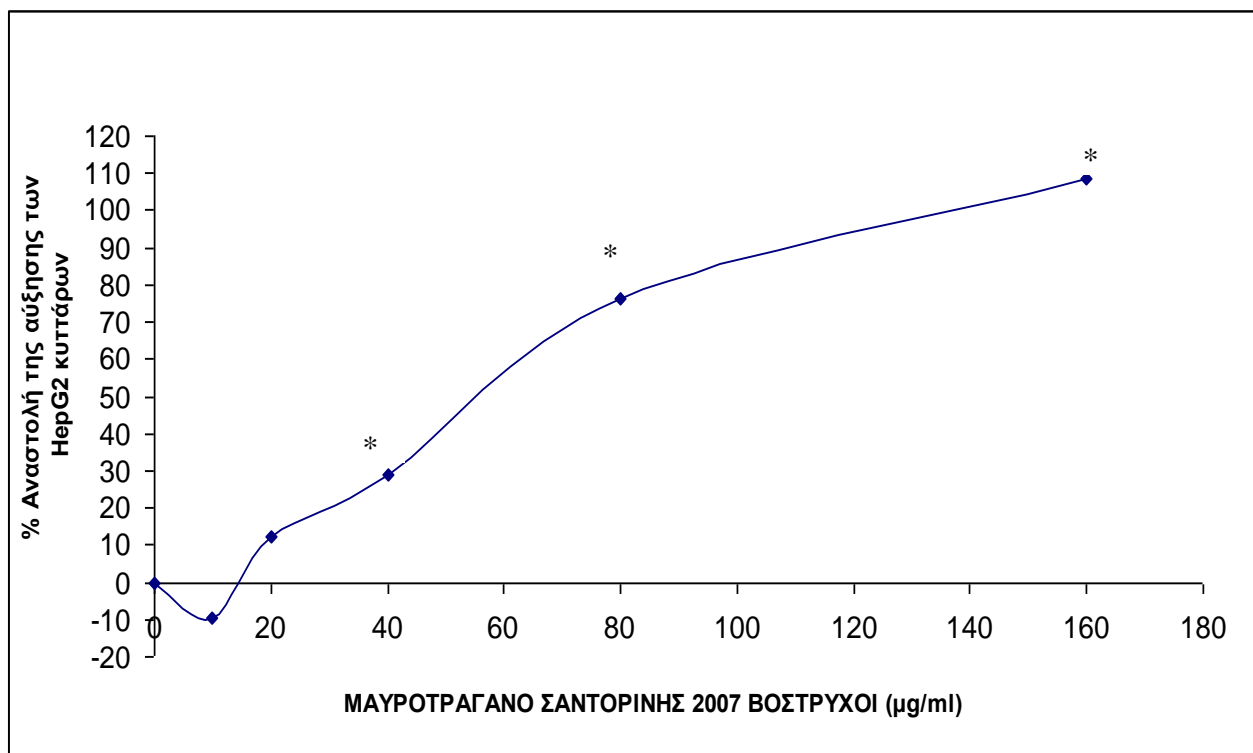




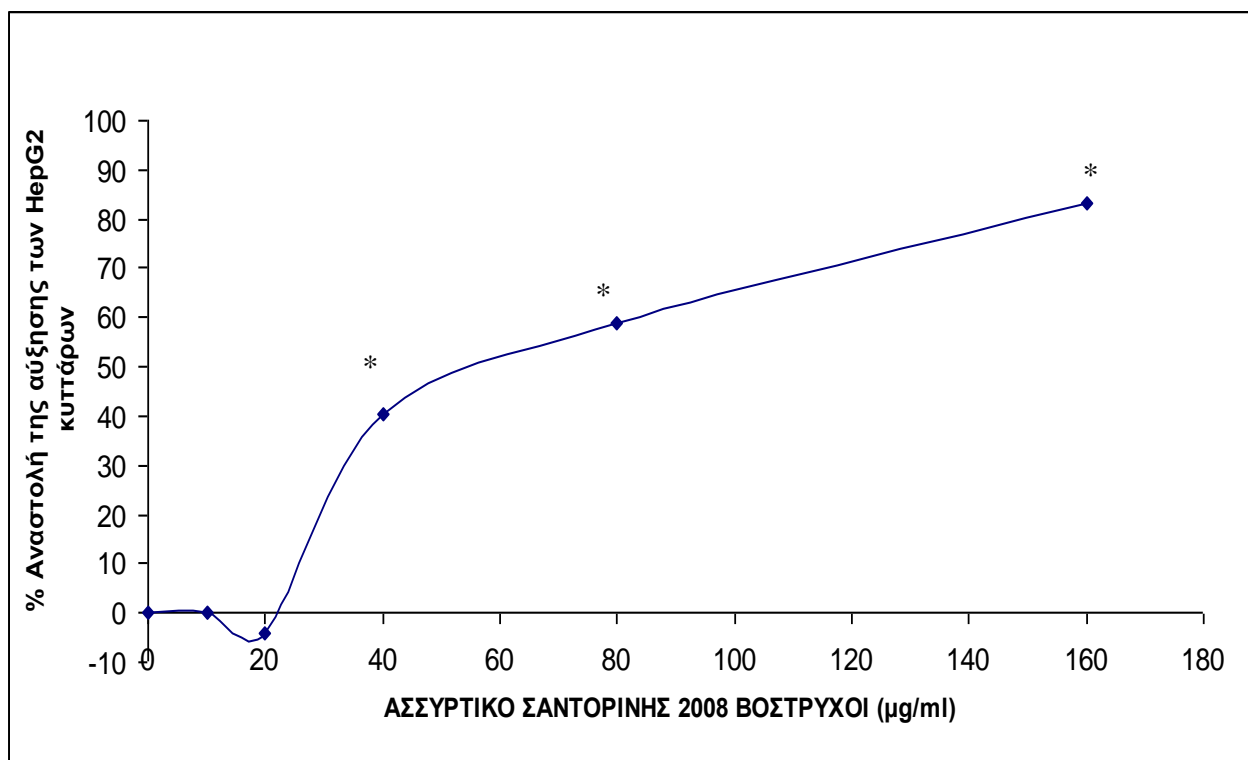
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>5.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Ασσύρτικου Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



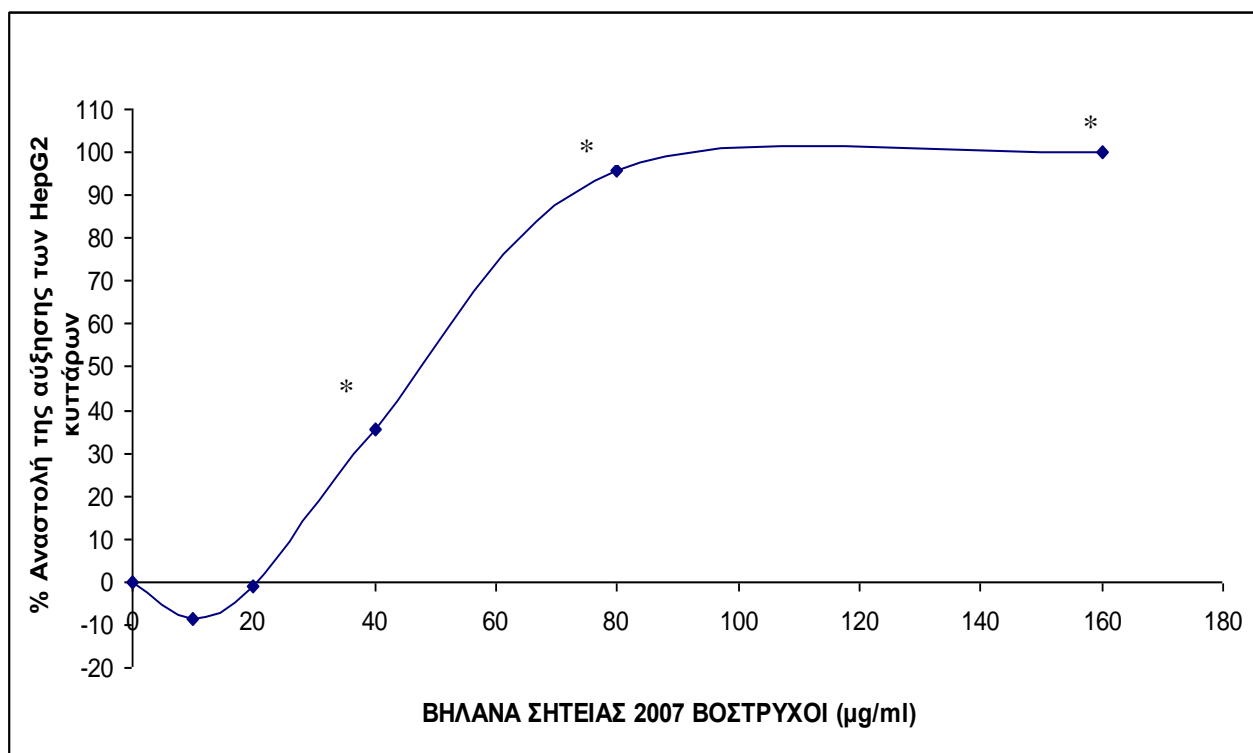
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>6.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Βοηδόματο Σαντορίνης 2007 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



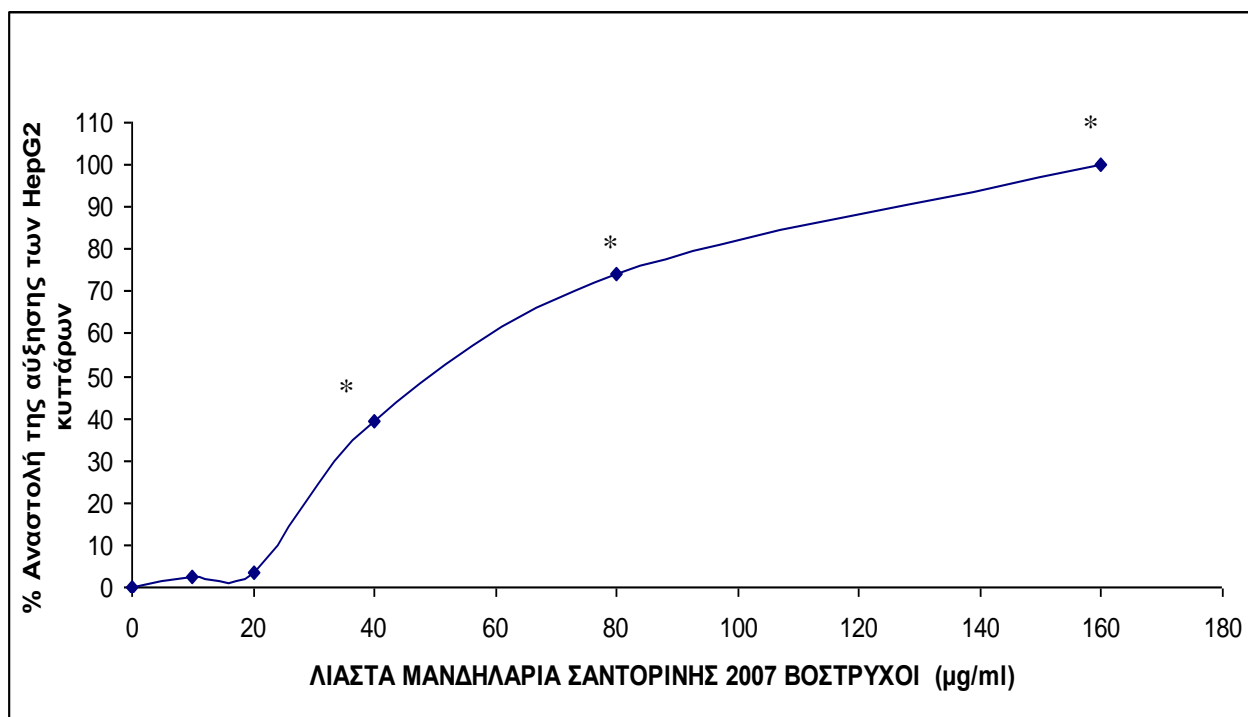
**Διάγραμμα 3<sup>α7</sup>**. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



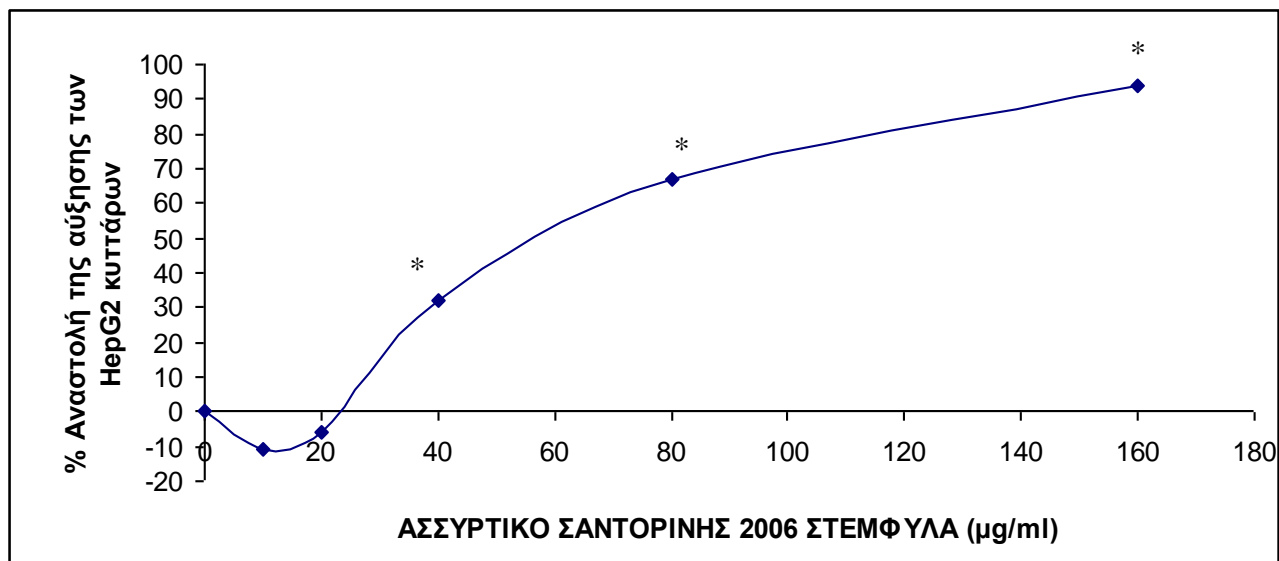
**Διάγραμμα 3<sup>α8</sup>**. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Ασύρτικου Σαντορίνης 2008 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



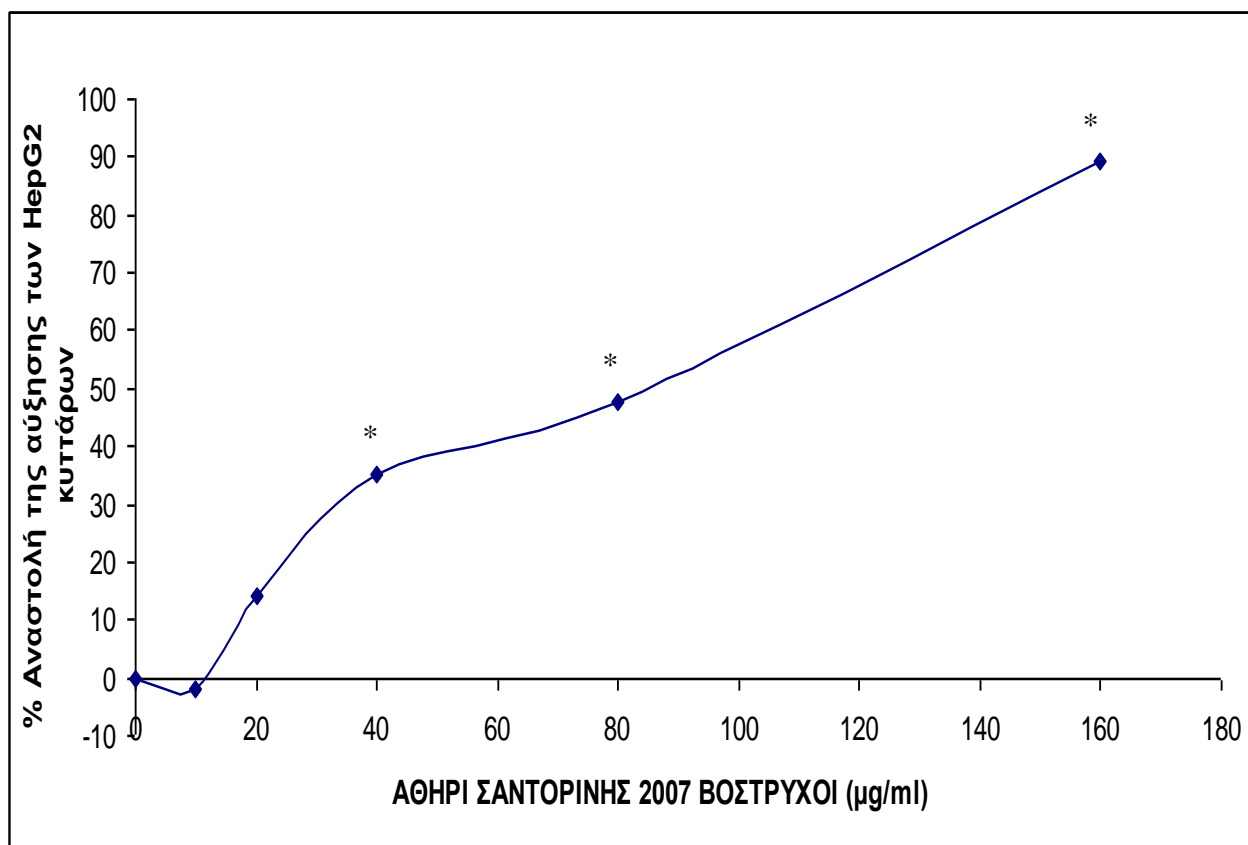
**Διάγραμμα 3<sup>ο</sup>**. Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Βηλάνα Σητείας2007 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>10.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων λιαστά Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

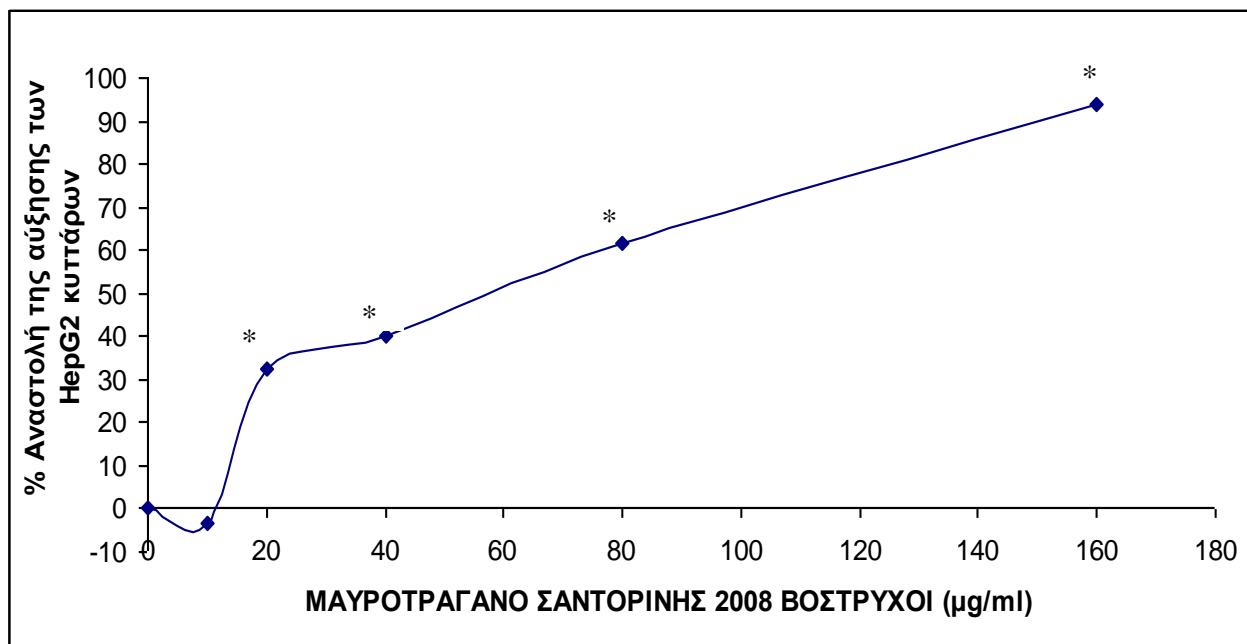


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>11.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στέμφυλων Ασσύρτικου Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

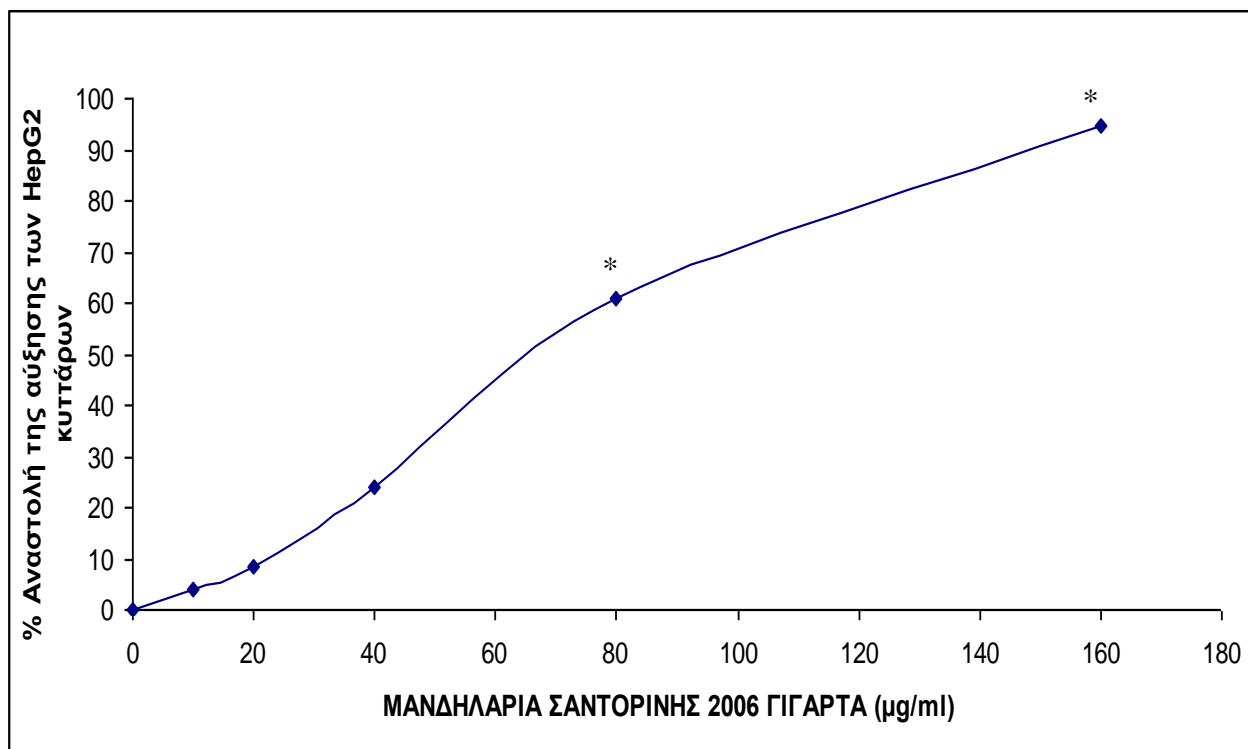


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>12.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Βοστρύχων Αθήρι Σαντορίνης 2007 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων ΗepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

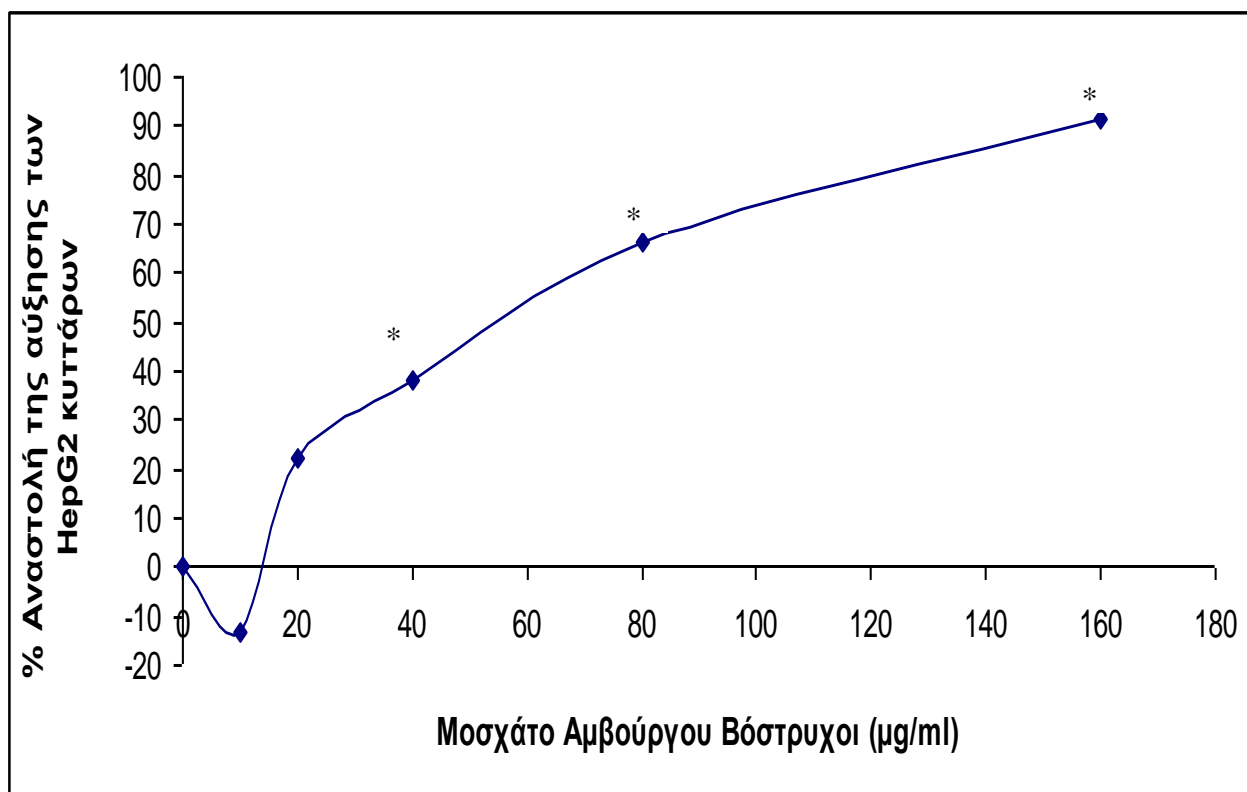




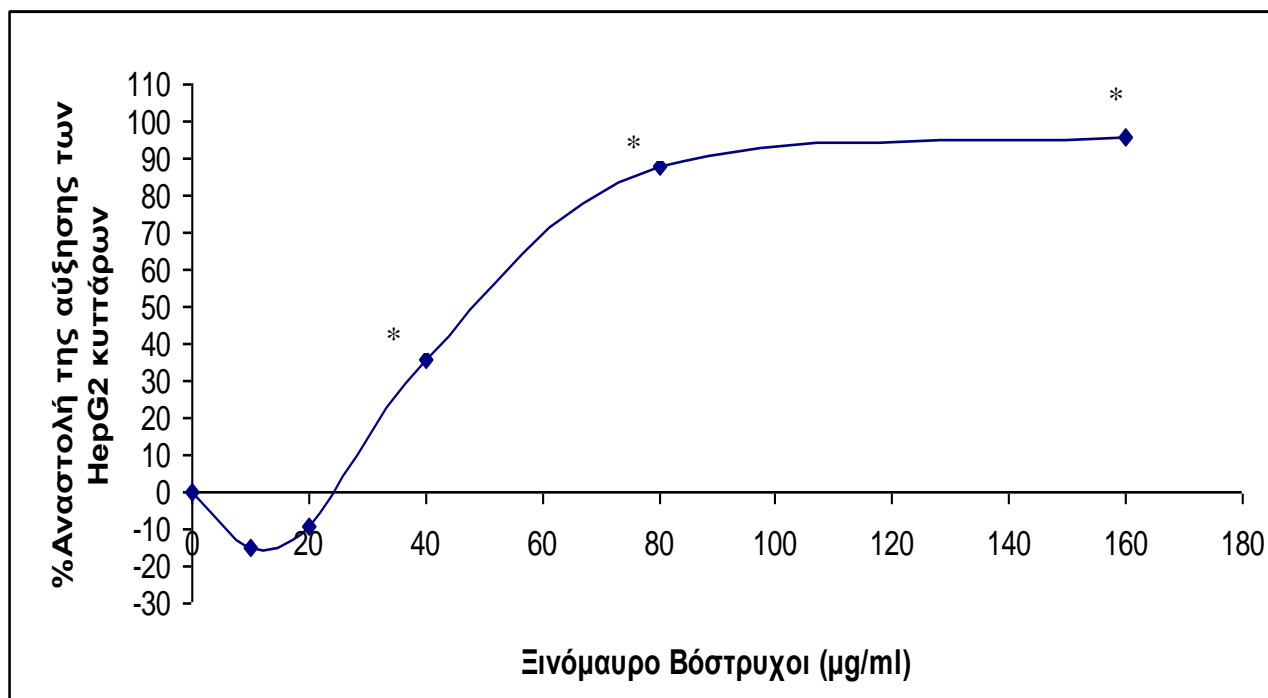
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>13.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



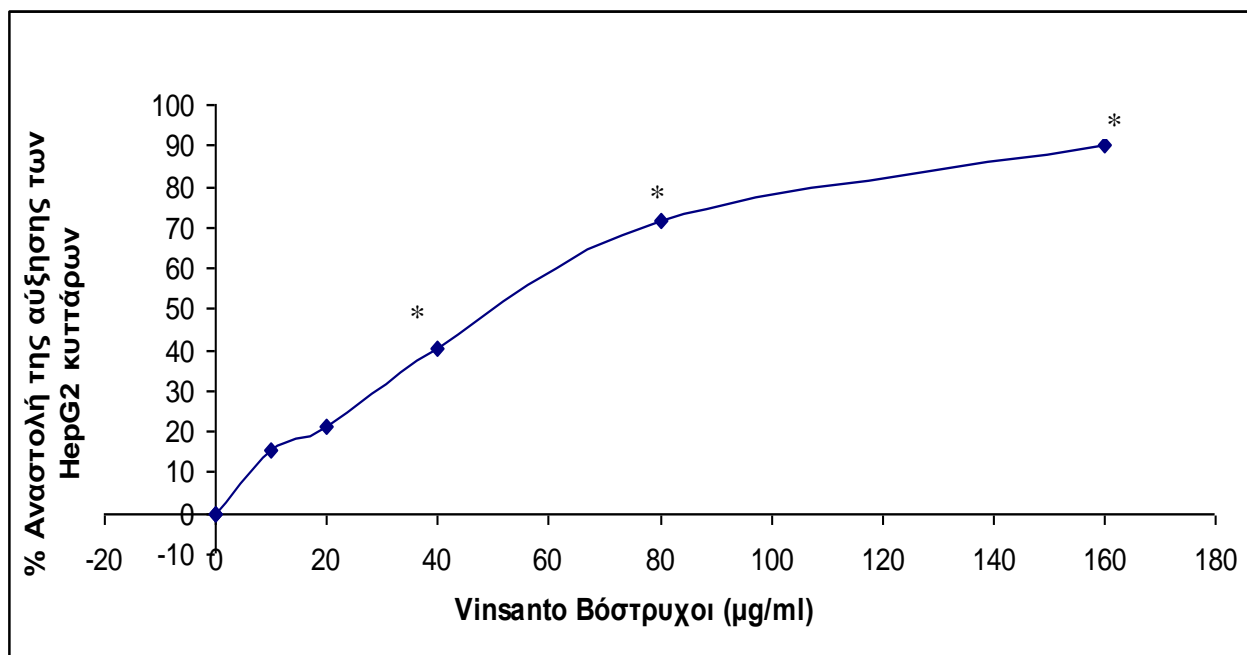
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>14.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Γίγαρτα Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



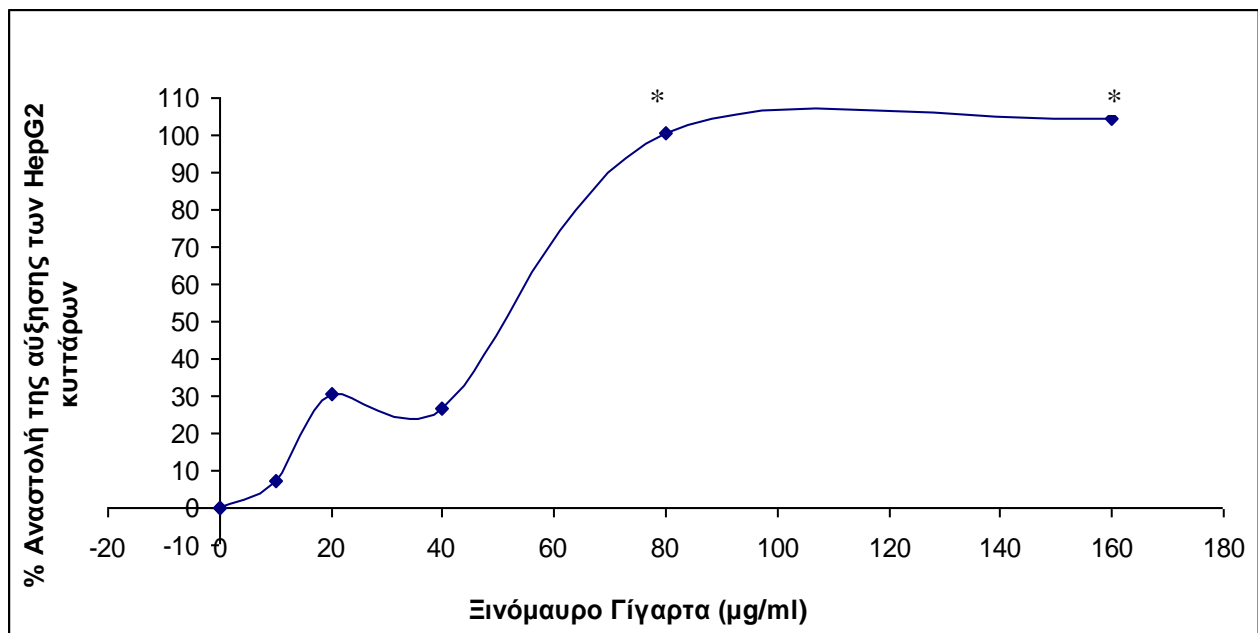
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>15.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Βοστρύχων Μοσχάτο Αμβούργου στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



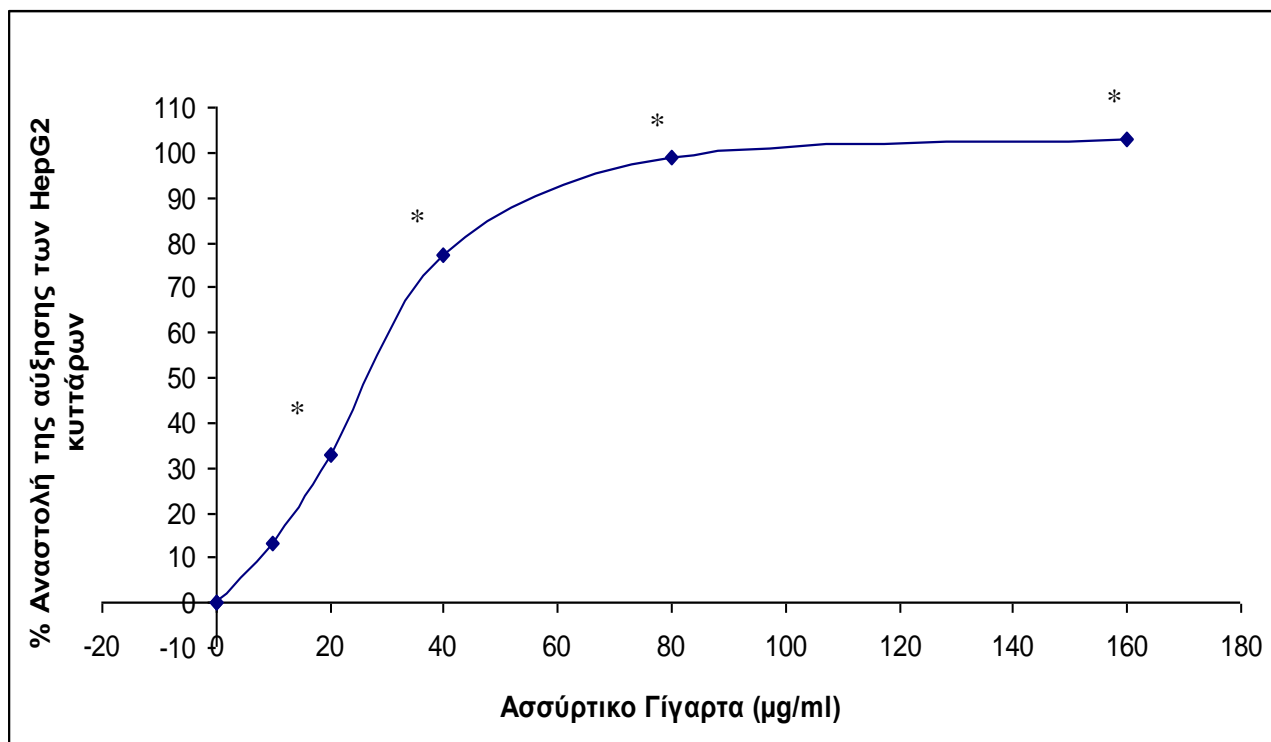
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>16.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Βοστρύχων Ξινόμαυρο στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



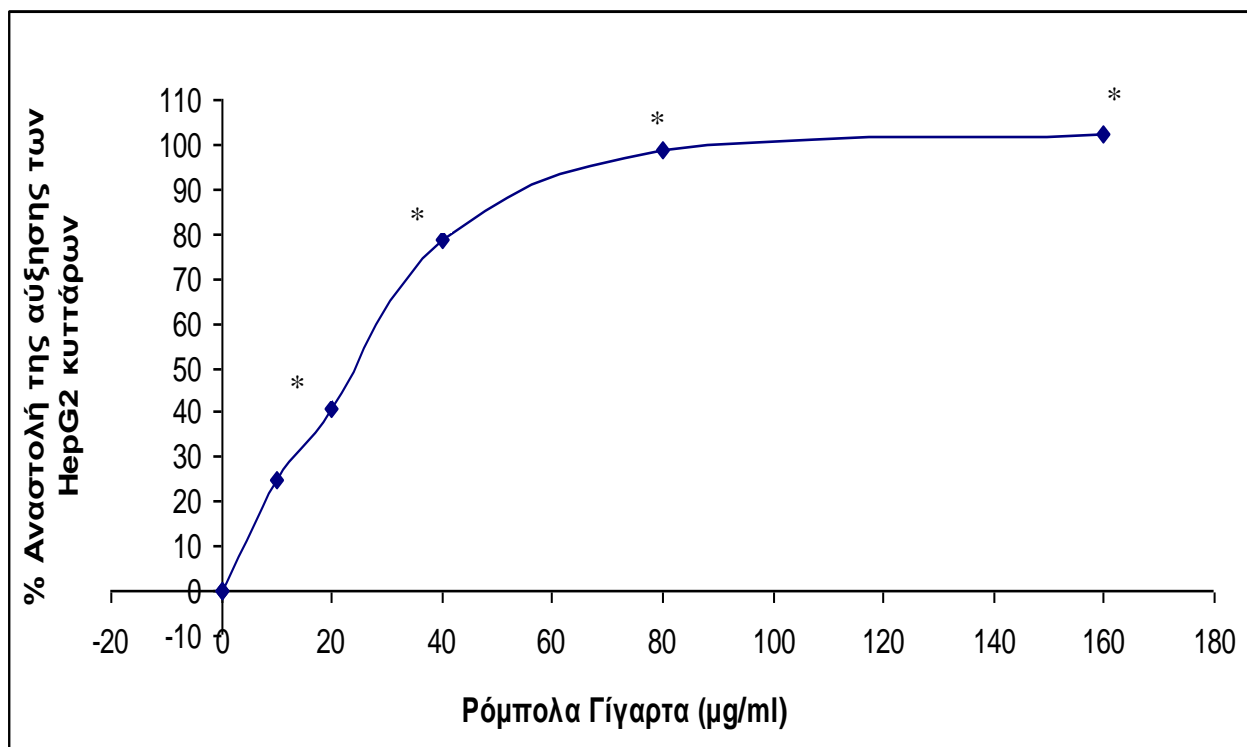
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>17.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος βοστρύχων Vinsanto στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>18.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Γίγαρτα Ξινόμαυρο στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

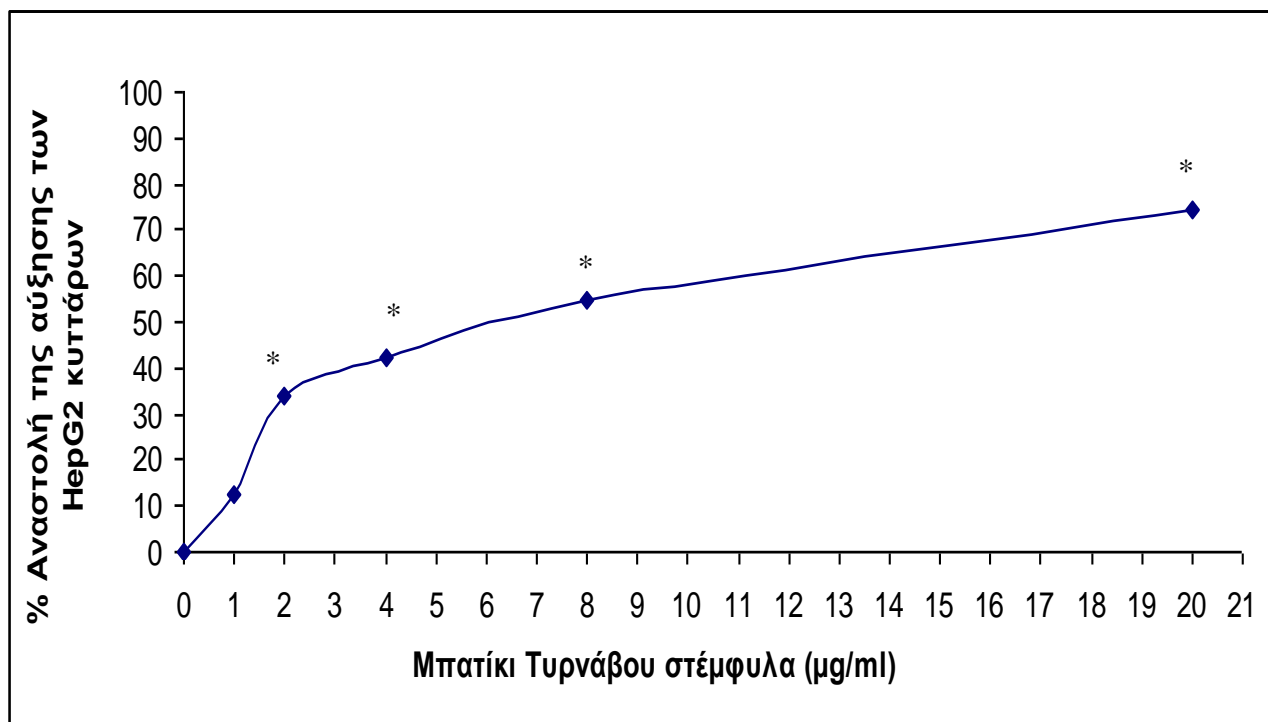


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>19.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Γίγαρτα Ασσύρτικου στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

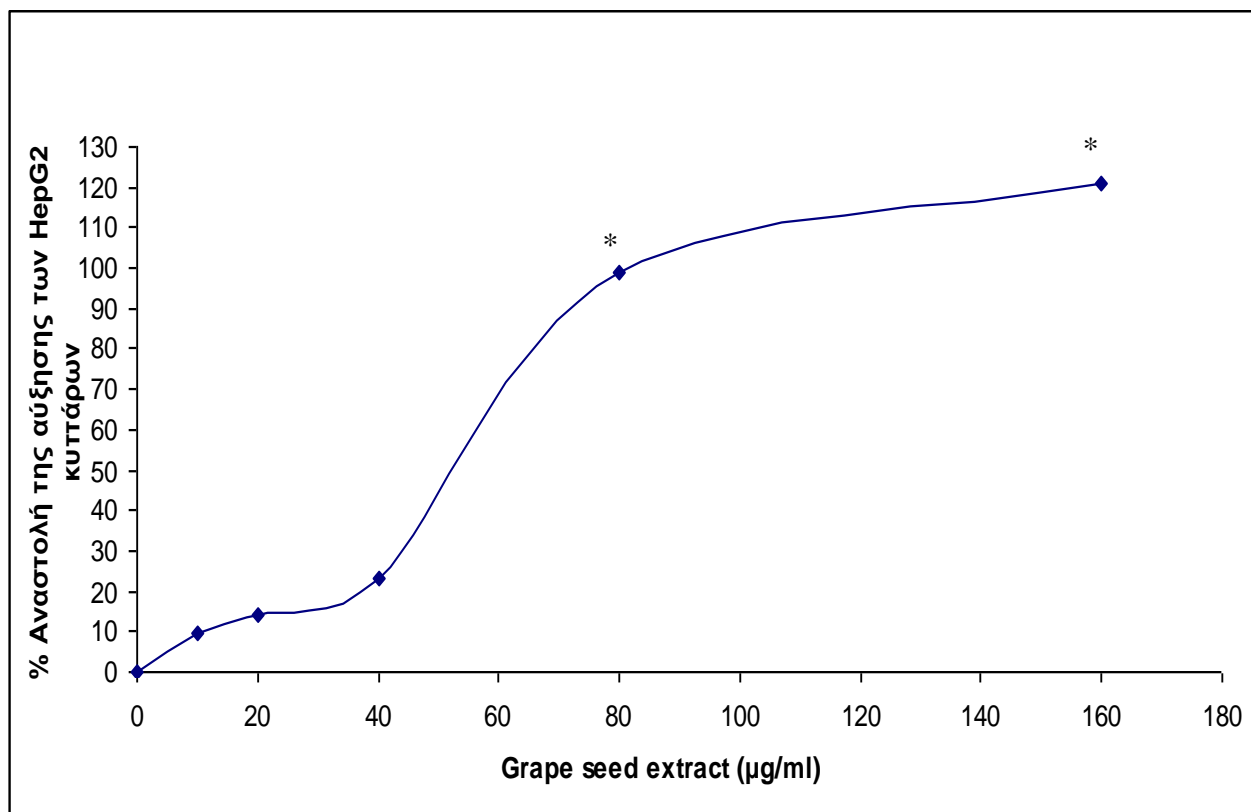


**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>20.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος Γίγαρτα Ρόμπολα στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).





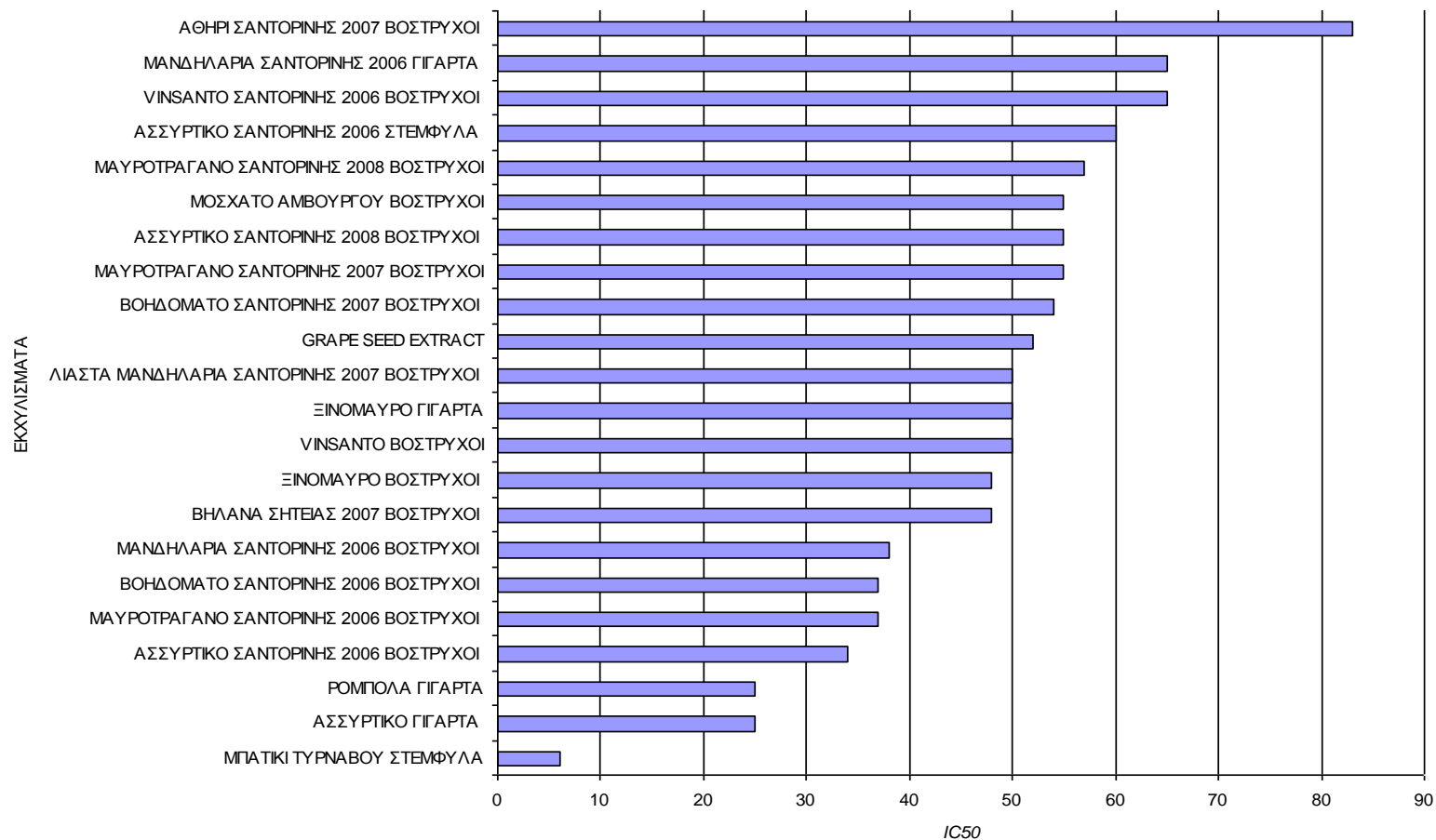
**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>21.** Απεικονίζεται η % αναστολή του εκχυλίσματος στέμφυλων Μπατίκι Τυρνάβου στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2. \* $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).



**Διάγραμμα 3<sup>ο</sup>22.** Απεικονίζεται η % αναστολή του grape seed extract στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων ΗεΡG2. \*  $p < 0,05$  σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό (θετικοί μάρτυρες).

### 3.β Πίνακας Εκχυλισμάτων

ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ IC50



**Διάγραμμα 3<sup>α</sup>23.** Απεικονίζονται οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου για την αλληλεπίδραση με την ρίζα ABTS .

#### **4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες του κρασιού αλλά και των εκχυλισμάτων από άμπελο (*Vitis vinifera*), ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού και ιδιαίτερα από τα γίγαρτα (τους σπόρους). Είναι χαρακτηριστικό ότι εκχυλίσματα από γίγαρτα με την ονομασία ‘Grape seed extract’ χρησιμοποιούνται διεθνώς ως συμπλήρωμα διατροφής κυρίως λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους αλλά και των χημειοπροστατευτικών/αντικαρκινικών (Velmurugan et al., 2010; Kaur et al., 2009). Υπάρχουν όμως μελέτες που δείχνουν ότι και τα εκχυλίσματα από τους βόστρυχους του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (Anastasiadi et al., 2009). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με την πιθανή αντικαρκινική δράση εκχυλισμάτων από βόστρυχους. Έτσι, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 15 εκχυλίσματα από βόστρυχους που προέρχονταν από 9 διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες αμπέλου για την πιθανή αντικαρκινική τους δράση. Επίσης, εξετάστηκαν και 5 εκχυλίσματα από γίγαρτα καθώς και 2 εκχυλίσματα από στέμφυλα για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Για την εξέταση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε η ανασταλτική τους δράση σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (HepG2). Ο λόγος που επιλέχτηκαν καρκινικά κύτταρα του ήπατος ήταν ότι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), είναι ένας από τις πιο συχνούς όγκους που αντιπροσωπεύει την πιο συχνή κακοήθεια σε όλο τον κόσμο και η τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο. Οι θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με HCC περιλαμβάνουν την χειρουργική εκτομή και τη μεταμόσχευση ήπατος αλλά ωστόσο ισχύουν μόνο για ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με πρώιμους όγκους. Όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, μέχρι στιγμής, το μόνο φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του HCC είναι το sorafenib, αλλά το κέρδος για επιβίωση είναι μέτριο. Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους οι ασθενείς με HCC έχουν κακή πρόγνωση είναι η πολυκεντρική εμφάνιση του HCC. Έτσι, ακόμη και αν ο πρώτος καρκίνος διαγνωστεί και απομακρυνθεί, ένας άλλος παθολογικός κυτταρικός κλώνος μπορεί να προκύψει για να σχηματίσουν ένα δεύτερο πρωτοπαθή καρκίνο. Επιπλέον, μπορεί να υπάρξει υποτροπιασμός σε ασθενείς με HCC που οφείλεται σε ενδοηπατική μετάσταση, δηλαδή την εμφάνιση ενός κυτταρικού κλώνου που προέρχεται από τη μετατροπή αρχικού κλώνου κυττάρων. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος για την θλιβερή πρόγνωση του HCC είναι η επιδείνωση της ηπατικής

λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας του HCC. Ως εκ τούτου, λόγω του γεγονότος ότι οι τρέχουσες θεραπείες για HCC δεν είναι τόσο αποτελεσματικές, χρειάζονται νέες στρατηγικές από τις οποίες η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η χορήγηση φυσικών ή συνθετικών ενώσεων για τη διακοπή ή αντιστροφή της καρκινογένεσης, αποτελεί μία από τις κυριότερες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα βόστρυχων ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις την αύξηση των καρκινικών ηπατοκυττάρων. Πιο ισχυρό από όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν ήταν το εκχύλισμα στέμφυλων από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου με τιμή IC<sub>50</sub> 8μg/ml. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> των εκχυλισμάτων βόστρυχων κυμαινόταν από 34 έως 83μg/ml. Τα πιο ισχυρά εκχυλίσματα βόστρυχου ήταν το Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006, το Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006, το Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 και το Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 με τιμές IC<sub>50</sub> 34, 37, 37 και 38μg/ml αντίστοιχα, ενώ τα πιο ασθενή ήταν Αθήρι Σαντορίνης 2007 και το Vinsanto Σαντορίνης 2006 με τιμές IC<sub>50</sub> 83 και 62μg/ml αντίστοιχα. Ήταν αξιοσημείωτο ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ήτανε παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων από τα γιγάρτα. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα βόστρυχου Ξινόμαυρο είχε τιμή IC<sub>50</sub> 48μg/ml ενώ το αντίστοιχο εκχύλισμα γιγάρτων είχε IC<sub>50</sub> 50μg/ml. Επίσης, εκχύλισμα βόστρυχου Μανδηλαριά Σαντορίνης είχε IC<sub>50</sub> 37μg/ml ενώ το αντίστοιχο εκχύλισμα γιγάρτων είχε IC<sub>50</sub> 65μg/ml. Όσον αφορά τη σύγκριση στην αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα στα εκχυλίσματα βόστρυχων από άσπρες και κόκκινες ποικιλίες αμπέλου δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Επίσης, εκχυλίσματα βόστρυχων της ίδιας ποικιλίας (π.χ. Ασσύρτικο Σαντορίνης, Μαυροτράγανο Σαντορίνης, Μανδηλαριά Σαντορίνης) αλλά διαφορετικής χρονιάς είχαν και διαφορετική ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, που οφείλεται πιθανώς στο ότι η χημική τους σύσταση δεν είναι ίδια λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών.

Όσον αφορά τη δράση των εκχυλισμάτων και τις πολυφαινόλες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Για παράδειγμα, ήτανε χαρακτηριστικό ότι το εκχύλισμα βόστρυχου Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 με τιμή IC<sub>50</sub> 37μg/ml είχε πολυφαινολική συγκέντρωση 318mg/g ενώ το ασθενέστερο εκχύλισμα Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007 είχε πολυφαινολική συγκέντρωση 415mg/g. Αυτό δείχνει ότι είτε η ποιοτική σύσταση και όχι η ποσοτική σε πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων παίζει σημαντικότερο ρόλο στον καθορισμό της αντικαρκινικής τους δράσης. Για παράδειγμα, η ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson έδειξε ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων

έναντι της αύξησης των HepG2 κυττάρων συσχετιζόταν με τη συγκέντρωση της προκυανιδίνης B3 ( $r = 0,634, p < 0.05$ ) που σημαίνει ότι αυτή η πολυφαινόλη έχει πιθανώς σημαντική αντικαρκινική δράση. Είναι αξιοσημείωτο ότι και σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ένα εκχυλίσμα από ένα είδος πεύκου (*Pinus massoniana*) που είχε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι ηπατικών καρκινικών κυττάρων (BEL-7402) ήτανε πλούσιο σε προκυανιδίνες όπως η B3 (Cui et al., 2005). Επίσης, η απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων και το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο μπορεί να οφείλεται στο ότι πιθανώς υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντικαρκινική δράση.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι εκχυλίσματα από βόστρυχους διάφορων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της αύξησης των καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 η οποία είναι συγκρινόμενη με αυτή των εκχυλισμάτων από γίγαρτα. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά στα οποία οφείλονταν αυτή η δράση ήταν η προκυανιδίνη B3. Κατά συνέπεια τα εκχυλίσματα βόστρυχων καθώς και τα συστατικά τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες. Είναι χαρακτηριστικό ότι από 100 kg σταφύλια προς οινοποίηση τα νωπά στέμφυλα είναι περίπου το 27%. Στην Ελλάδα την πενταετία 96-2000 παρήχθησαν περίπου 142.000 τόνοι στέμφυλα. Τα στέμφυλα περιλαμβάνουν τη νωπή πούλπα, τα γίγαρτα, και τους βόστρυχους και αποτελούν τα υποπροϊόντα των οινοποιείων. Υπολογίζεται πως από 10 kg νωπά στέμφυλα παραλαμβάνονται 3 kg νωπή πούλπα, 2,5 kg νωπά γίγαρτα και 2 kg βόστρυχοι. Το υπόλοιπο αντιπροσωπεύει απώλειες κυρίως από υγρή μορφή. Συνεπώς, από τους 142.000 τόνους νωπά στέμφυλα προκύπτουν 28.000 τόνοι βόστρυχων. Αυτά τα υποπροϊόντα δεν αξιοποιούνται βιομηχανικά, παρά μόνο σε πολύ μικρό ποσοστό για ζωοτροφές. Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις η απόρριψή τους δημιουργεί περιβαλλοντολογικά προβλήματα. Συνεπώς, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης εκχυλίσματα βόστρυχων θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής ή για την ανάπτυξη βιολειτουργικών τροφίμων με χημειοπροστατευτική δράση όπως γίνεται με τα εκχυλίσματα από τα γίγαρτα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική βιβλιογραφία

Chemoprevention of liver cancer by phytochemicals Dimitrios Stagos, Dimitrios Kouretas
Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
Ντόζη-Βασιλειάδου Ι, Μουρελάτος Δ. Κυτταρογενετικές μέθοδοι για τη βελτίωση και καθοδήγηση της χημειοθεραπείας. Σε: Εξελίξεις και προοπτικές στην έρευνα βελτίωσης της χημειοθεραπείας του καρκίνου. University Studio Press: Θεσσαλονίκη, 1989.
Τοσσίδης Ι. Γενική και Ανόργανη Χημεία. Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, 1990.
Τριανταφυλλίδης Κ. Κλασική και Μοριακή Γενετική. Εκδόσεις Κυριακίδη: Θεσσαλονίκη, 1992.
Τσακόπουλος Μ, Vander A, Sherman J, Luciano D. Φυσιολογία του Ανθρώπου. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη: Αθήνα, 2001.
Κοινοφελής μη κερδοσκοπική οργάνωση φίλων του καρκίνου <a href="http://www.bestrong.org.gr">http://www.bestrong.org.gr</a>

### Ξένη βιβλιογραφία

Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. <i>Ann Med.</i> 1997 29:95–120.
Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ, Haroutounian SA. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification by products. <i>J Agric Food Chem.</i> 2009 Jan 28;57(2):457-63.
Asquith TN, Butler LG. Interactions of condensed tannins with selected proteins. <i>Phytochemistry.</i> 1986 25:1591-1593.
Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. <i>Drugs Exp Clin Res.</i> 1998 24:133–138.
Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. <i>Ann N Y Acad Sci.</i> 2002 957:210–229.
Bosch FX, Ribes J, Borràs J., Epidemiology of primary liver cancer. <i>Semin Liver Dis.</i> 1999;19(3):271-85.
Brunt EM, Ramrakhiani S, Cordes BG, Neuschwander-Tetri BA, Janney CG, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. <i>Mod Pathol.</i> 2003 Jan;16(1):49-56.
Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. <i>Trends Pharmacol Sci.</i> 1992 13:245-251.
Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. <i>J Sci Food Agric.</i> 2000 80:1044–1062.
Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxi A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. <i>J Hepatol.</i> 2001 Apr;34(4):593-602.
Chen XH, Zhang BH, Yin X, Qiu SJ, Fan J, Ren ZG, Xia JL, Wang YH, Ye SL, Gan YH. [Effect of postoperative adjuvant transarterial chemoembolization upon early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma]. <i>Zhonghua Yi Xue Za Zhi.</i> 2010 Mar 30;90(12):826-9. Chinese.

Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH.. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. <i>Am J Cardiol</i> 2001 5:553-555.
Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. <i>J Food Sci Agric</i> . 2000 80:1118–1125.
Clifford MN. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Food Sci Agric</i> . 2000 80:1063–1072.
Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Sci Food Agric</i> . 1999 79:362–372.
Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. <i>J Mol Med</i> . 2000 78:333-336.
Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. <i>J Nutr Bioch</i> . 1996 7:66-76.
Cui YY, Xie H, Qi KB, He YM, Wang JF. Effects of <i>Pinus massoniana</i> bark extract on cell proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. <i>World J Gastroenterol</i> . 2005 Sep 14;11(34):5277-82.
Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. <i>Ann Nutr Metab</i> . 1997 41: 353-357.
Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. <i>Gastroenterology</i> . 2004 Nov;127(5):1372-80.
De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albini A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. <i>Mutat Res</i> . 2001 480-481:9-22.
De Flora S, Ramel C. Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. <i>Basic Life Sci</i> . 1990 52:461-462
Ebara M, Ohto M, Sugiura N, Kita K, Yoshikawa M, Okuda K, Kondo F, Kondo Y. Percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. Study of 95 patients. <i>J Gastroenterol Hepatol</i> . 1990 Nov-Dec;5(6):616-26.
Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto SI, Dono K, Nakamori S, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M. Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by posthepatectomy liver failure. <i>Dig Dis Sci</i> . 2000 Jul;45(7):1383-8.
El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. <i>Gastroenterology</i> . 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S27-34.
Elson CE, Maltzman TH, Boston JL, Tanner MA, Gould MN. Anti-carcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. <i>Carcinogenesis</i> . 1988 9:331-332.
Ferguson LR, Lim IF, Pearson AE, Ralph J, Harris PJ. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. <i>Mutat Res</i> . 2003 542:49-58.
Gary D. Stoner, Mark A. Morse,1 and Gary J. Kelloff2. Perspectives in Cancer Chemoprevention <i>Environ Health Perspect</i> 105(Suppl 4):945-954 (1997)
Hill DL, Grubbs CJ. Retinoids and cancer prevention. <i>Annu Rev Nutr</i> . 1992 12:161-181.
Ho JW, Pang RW, Lau C, Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT <i>Hepatology</i> . 2006 Oct;44(4):836-43. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma.
Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. <i>Science</i> . 1997 278:1073-1077.
Horgan AM, Dawson LA, Swaminath A, Knox JJ. Sorafenib and Radiation Therapy for the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. <i>J Gastrointest Cancer</i> . 2010 Aug 4.



Huang FL, Roop DR, De Luca LM. Vitamin A deficiency and keratin biosynthesis in cultured hamster trachea. <i>In Vitro Cell Dev Biol.</i> 1986 22:223.
Huang MT, Ferraro T, Ho CT. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT eds. American Chemical Society: Washington, DC, 1994.
Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. <i>Cancer Res.</i> 1991 51:813-819.
Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model. <i>Cancer.</i> 1991 Nov 15;68(10):2150-4.
Iseki K, Nakao K, Nakata K, Shima Y, Hamasaki K, Kato Y, Ishii N, Eguchi K. Diverse regulations of albumin gene expression by hepatocyte growth factor in HepG2 human hepatoma cells and primary culture of rat hepatocytes. <i>Int J Oncol.</i> 2000 Jun;16(6):1141-5.
Jackson RS. Chemical constituents of grapes and wine. In Wine Science: Principles and applications. Taylor SL ed. Academic Press: San Diego, 1993.
Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. <i>Cancer.</i> 1992 70:977s-982s.
Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, Iijima A, Urushihara A, Kiyosawa K, Okuda M, Hino K, Okita K. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. <i>Hepatology.</i> 1998 May;27(5):1394-402.
Kaur M, Agarwal C, Agarwal R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. <i>J Nutr.</i> 2009 Sep;139(9):1806S-12S. Epub 2009 Jul 29.
Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: Chemical induction of cancer modulation and combination of effects. Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, 1997.
Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. <i>Pharmacol Ther.</i> 1998 78:167-209.
Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussel M, Attali P. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. <i>Gastroenterology.</i> 1991 101:635-639.
Lang BH, Poon RT, Fan ST, Wong J. Outcomes of patients with hepatocellular carcinoma presenting with variceal bleeding. <i>Am J Gastroenterol.</i> 2004 Nov;99(11):2158-65.
Lea AGH, Bridle P, Timberlake CF, Singleton VL. The procyanidins of white grapes and wines. <i>Am J Enol Vitic.</i> 1979 30:289-300.
Leung EY, Roxburgh CS, Leen E, Horgan PG. Combined resection and radiofrequency ablation for bilobar colorectal cancer liver metastases. <i>Hepatogastroenterology.</i> 2010 Jan-Feb;57(97):41-6.
Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat ( <i>Triticum durum</i> L.) grain and its milling fractions. <i>J Cereal Sci.</i> 1997 25:103-110.
Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. <i>Am J Clin Nutr.</i> 2003 78:517S-520S.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. <i>Am J Clin Nutr.</i> 2004 79:727-747.
Meric F, Patt YZ, Curley SA, Chase J, Roh MS, Vauthey JN, Ellis LM. Surgery after downstaging of unresectable hepatic tumors with intra-arterial chemotherapy. <i>Ann Surg Oncol.</i> 2000 Aug;7(7):490-5.
Mirvish SS. Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: Inhibition of tumor induction and development. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, 1981.
Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi CI, Desai DH, Amin SG, Chung FL. Structure activity relationships for inhibition of 4-methylnitrosamino-1-3(pyridyl)-1-dutanone (NKK) lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. <i>Cancer Res.</i> 1991 51:1846-1850.
Moriwaki H. Prevention of liver cancer: basic and clinical aspects <i>Exp Mol Med.</i> 2002 Nov 30;34(5):319-25.
Nagasue N, Yamanoi A, el-Assal ON, Ohmori H, Tachibana M, Kimoto T, Kohno H. Major compared with limited hepatic resection for hepatocellular carcinoma without underlying cirrhosis: a retrospective analysis. <i>Eur J Surg.</i> 1999 Jul;165(7):638-46.
Nepka C, Asproдини E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. <i>Eur J Drug Metab Pharmacokinet.</i> 1999 24: 183-189.
Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Sponseller CA, Hampton K, Bacon BR. Interim results of a pilot study demonstrating the early effects of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone on insulin sensitivity, aminotransferases, hepatic steatosis and body weight in patients with non-alcoholic steatohepatitis. <i>J Hepatol.</i> 2003 Apr;38(4):434-40.
Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. <i>Dig Liver Dis.</i> 2010 Jul;42 Suppl 3:S206-14.
Nobuoka A, Ishigaki S, Hirayama A, Takada K, Sato T, Takayama T.[A case of primary hepatic lymphoma] <i>Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.</i> 1998 Nov;95(11):1254-60.
Orlando A, D'Antoni A, Cammà C, Albanese M, Livraghi T, Torzilli G, Virdone R, Sciarrino E, Simonetti RG, Maringhini A, Pagliaro L, Cottone M. Treatment of small hepatocellular carcinoma with percutaneous ethanol injection: a validated prognostic model. <i>Am J Gastroenterol.</i> 2000 Oct;95(10):2921-7.
Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J. Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? <i>Ann Surg.</i> 2002 Nov;236(5):602-11.
Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. <i>Cancer Lett.</i> 2006 Aug 28;240(2):157-69. Epub 2005 Oct 17. Review.
Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. <i>Cancer Res.</i> 1987 47:5340-5346.
Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. <i>Lancet.</i> 1992 Jun 20;339(8808):1523-6
Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub MP. Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin. <i>Arch Biochem Biophys.</i> 1990 283:107-113.
Sayer JM, Yagi H, Wood AW, Conney AH, Jerina DM. Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid. <i>Am Chem Soc.</i> 1982 104:5562-5564.
Shahidi F, Nacz M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. <i>J Nutr.</i> 2000 130:2073S-2085S.
Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. <i>J Clin Lab Anal.</i> 1997 11:287-313
Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. <i>Nat Clin Pract Oncol.</i> 2005 Oct;2(10):518-25.
Tanaka H, Tsukuma H, Yamano H, Okubo Y, Inoue A, Kasahara A, Hayashi N. Hepatitis C virus 1b(II) infection and development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. <i>J Epidemiol.</i> 1998 Oct;8(4):244-9.
Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. <i>Crit Rev Food Sci Nutr.</i> 1997 37:771-785.
Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. <i>J Sci Food Agric.</i> 2000 80:1073–1080.
Uenishi T, Hirohashi K, Kubo S, Hamba H, Ikebe T, Yamamoto T, Tanaka H, Wakasa K, Haba T, Kinoshita H. A pancreatic anaplastic carcinoma of spindle-cell form. <i>Int J Pancreatol.</i> 1999 Dec;26(3):201-4.
Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R, Agarwal C. Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats. <i>Mol Carcinog.</i> 2010 Jul;49(7):641-52.
Wainfan E, Dizik M. Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver tRNA methyltransferase activities in carcinogen-treated rats. <i>Carcinogenesis.</i> 1987 8:615-617.
Wei DZ, Yang JY, Liu JW, Tong WY. Inhibition of liver cancer cell proliferation and migration by a combination of (-)-epigallocatechin-3-gallate and ascorbic acid. <i>J Chemother.</i> 2003 Dec;15(6):591-5.
Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. <i>Science.</i> 2002 296:695-698.
Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. <i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> 1992 89:2399-2403.
Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. <i>Carcinogenesis.</i> 1991 12:2109-2114
Zhang K, Das NP. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione transferases. <i>Biochem Pharmacol.</i> 1994 47:2063–2068.
Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. <i>Carcinogenesis.</i> 1999 20:1737-1745.