



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

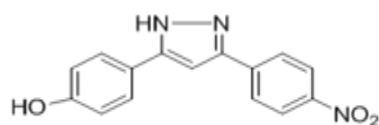
Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

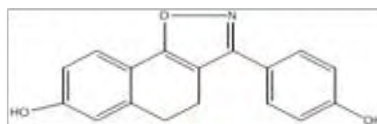
*Κουτσοθεοδώρα Ελένη*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ  
ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ  
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ VEGF**

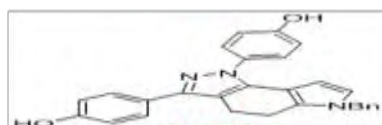
***EFFECTS OF SYNTHETIC HETEROCYCLIC CHEMICAL COMPOUNDS ON  
CANCER CELL GROWTH AND INHIBITION OF VEGF***



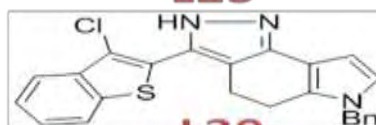
**L17**



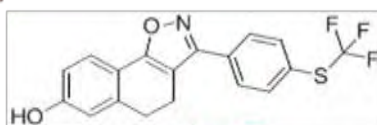
**L23**



**L24**



**L39**



**L45**

Λάρισα 2012

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Στάγκος Δημήτριος(επιβλέπων):** : Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Κουρέτας Δημήτριος** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας  
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, για τη καθοδήγηση στην εκτέλεση των πειραμάτων και για τη πολύτιμη βοήθεια στην συγγραφή της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα , για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

## Περίληψη

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη σε σειρά πιο συχνή αιτία θανάτου ανά τον κόσμο, μετά τις καρδιοπάθειες. Οι θεραπείες που χρησιμοποιούνται δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές καθώς δεν προσφέρουν μόνιμη ίαση, αφενός μεν γιατί η συχνότητα επανεμφάνισης είναι μεγάλη, αφετέρου δε είναι επώδυνες για τον ασθενή. Έτσι, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του καρκίνου με τη χορήγηση φυσικών ή συνθετικών χημικών ενώσεων, καθώς και με νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Η πτυχιακή μου εργασία είχε σαν θέμα τη μελέτη της αναστολής του καρκίνου μέσω της αναστολής της κυτταρική αύξησης καθώς και μέσω της αναστολής της αγγειογένεσης. Μελέτησα λοιπόν, πέντε συνθετικές οργανικές ετεροκυκλικές ενώσεις ως προς την αναστολή της κυτταρικής αύξησης σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος (HepG2) και σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7) με τη μέθοδο XTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Πιο ισχυρή αποδείχτηκε η ένωση L23 με τιμή IC50 3  $\mu\text{M}$  στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος και 5  $\mu\text{M}$  στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Το εύρος των τιμών IC50 των ενώσεων κυμαινόταν από 3 έως 140  $\mu\text{M}$  για τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος και από 5 έως 140  $\mu\text{M}$  για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα αυτών των ενώσεων να αναστέλλουν την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF), του σημαντικότερου αγγειογενετικού παράγοντα, σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) με τη μέθοδο της ELISA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χημική ένωση L39 έχει την ικανότητα να αναστέλλει την έκφραση του VEGF κατά 21% και 34% σε συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{M}$  και 40  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα. Επίσης, και η ένωση L24 ανέστειλε σε μικρότερο βαθμό την έκφραση του VEGF κατά 17% και 19% σε συγκεντρώσεις 10 $\mu\text{M}$  και 20  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα..

## Περιεχόμενα

### 1. Εισαγωγή

7

1.1. Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης

1.2. Καρκίνος του ήπατος, του μαστού και του τραχήλου της μήτρας και οι αντίστοιχες 9  
καρκινικές κυτταρικές σειρές.

1.2.1 Καρκίνος του ήπατος-HepG2

1.2.2.Καρκίνος του μαστού – MCF

1.2.3.Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας -HeLa

1.3. Ετεροκυκλικές συνθετικές χημικές ενώσεις 14

1.4 Αγγειογένεση –VEGF 19

1.4.3.1. Αγγειογένεση

1.4.3.2. VEGF: Βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης

1.5 Σκοπός του πειράματος 22

### 2. Υλικά και μέθοδοι

2.1.Υλικά 23

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

2.1.2. Θρεπτικά υλικά

2.1.3. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2, HeLa ,MCF-7

2.2.Μέθοδοι 24

2.2.1 Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT

Αρχή μεθόδου

Πειραματική διαδικασία

2.2.2Προσδιορισμός της αναστολής της έκκρισης του VEGF στα κύτταρα HeLa με τη μέθοδο της Elisa σάντουιτς .

Αρχή μεθόδου

Πειραματική διαδικασία

<b>3. Αποτελέσματα</b>	28
<b>4. Συζήτηση</b>	41
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	43

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης**

Με βάση τα αποτελέσματα από πειραματικά μοντέλα σε πειραματόζωα, επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπινους καρκίνους και τις πρόσφατες μελέτες της έρευνας των ογκογονιδίων, έχει αποδειχθεί ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο με ικανότητα μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενο ιστό, δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου. Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται να περιλαμβάνει την ανάπτυξη διάφορων φαινοτυπικών αλλοιώσεων, όπως την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση, την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ' επαφής, την απώλεια της ικανότητας να επικοινωνεί με τα γειτονικά κύτταρα και την ικανότητα να διηθεί και να μεθίσταται. Η καρκινική μάζα είναι μονοκλωνικής προέλευσης, από ένα αρχικά εξαλλαγμένο καρκινικό κύτταρο. Ωστόσο, 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. Το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης φαίνεται ότι περιλαμβάνει τρία στάδια, που στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς εξέλιξης.





**3.Progression:** στο τρίτο αυτό στάδιο (φάση προόδου) εμφανίζονται οι γενετικές ανωμαλίες που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο (Hennings H και συν, 1983). Το μεταλλαγμένο και εξαρτώμενο από τον προαγωγέα κύτταρο μετατρέπεται σε ένα ανεξάρτητο καρκινικό κύτταρο.

Συχνά, οι φάσεις της προαγωγής-προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση που ίσως τελικά να είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα.

Η καρκινογένεση περιλαμβάνει τις γενικότερες μεταβολικές διεργασίες, μέσω των οποίων ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό. Η κατανόηση της μεταβολικής αυτής ασθένειας γίνεται ακόμη πιο δύσκολη όταν αντιμετωπίζει κανείς τον καρκίνο σαν ένα φαινόμενο σε επίπεδο οργανισμού, διότι οι παράμετροι που υπεισέρχονται στην περίπτωση αυτή αυξάνονται δραματικά, καθιστώντας την πρόταση ενός μοντέλου εξαιρετικά δύσκολη.

## **1.2. Καρκίνος του ήπατος, του μαστού και του τραχήλου της μήτρας και οι αντίστοιχες καρκινικές κυτταρικές σειρές.**

### **1.2.1. Καρκίνος του ήπατος- κύτταρα HepG2**

Ο καρκίνος του ήπατος είναι ο πέμπτος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως. Είναι ταυτόχρονα η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτων λόγω καρκίνου. Ο αριθμός των νέων περιστατικών καρκίνου του ήπατος αυξάνεται γρήγορα σε πολλές χώρες του κόσμου. Υπάρχουν ανησυχίες ότι η νόσος είναι δυνατόν να πάρει επιδημικές διαστάσεις στο άμεσο μέλλον. Οι λόγοι της σημαντικής αύξησης περιλαμβάνουν την ηπατίτιδα C, τη χρήση ναρκωτικών ενδοφλεβίως, την παχυσαρκία και το διαβήτη τύπου 2. Οι άνδρες προσβάλλονται από καρκίνο του ήπατος συχνότερα συγκριτικά με τις γυναίκες (8 έως 10 φορές μεγαλύτερη στους άντρες από ότι στις γυναίκες.) Το συκώτι των ανδρών παρουσιάζει διαφορές από το συκώτι των γυναικών γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγεί τις διαφορετικές συχνότητες καρκίνου του ήπατος στα δύο φύλα. Οι διαφορές αυτές έχουν σχέση με την εφηβεία, την αυξητική ορμόνη και τα γονίδια που εκφράζονται στο συκώτι των ανδρών και γυναικών αντίστοιχα. Το συκώτι των ανδρών πιθανόν να αντιδρά διαφορετικά σε διάφορους παράγοντες όπως τα αντιβιοτικά, άλλα φάρμακα ή ουσίες από ότι το συκώτι των γυναικών.

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

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

Όσο περισσότερους παράγοντες κινδύνου παρουσιάζει ένα άτομο, τόσα αυξάνονται οι πιθανότητες του να προσβληθεί από τη νόσο. Ωστόσο πολλοί άνθρωποι με γνωστούς παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του ήπατος δεν προσβάλλονται από τη νόσο. Ο καρκίνος του ήπατος, στα αρχικά του στάδια δεν προκαλεί συμπτώματα. Εξελίσσεται χωρίς να γίνεται αντιληπτός.

Μία από τις κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη του καρκίνου του ήπατος είναι τα HepG2 καρκινικά ηπατικά κύτταρα. Πρόκειται για μια σειρά αθάνατων κυττάρων που προέρχεται από τον ηπατικό ιστό ενός δεκαπεντάχρονου καυκάσιου Αμερικανού που είχε ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Μορφολογικώς πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα.



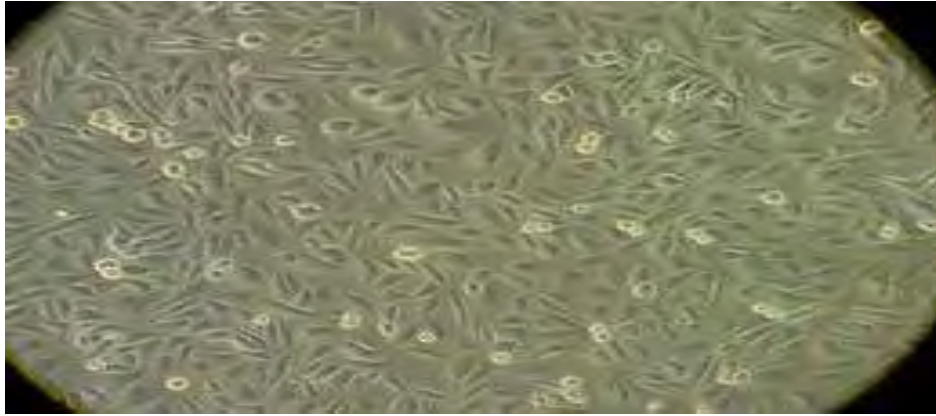
**Εικόνα 2: HepG2 καρκινικά κύτταρα του ήπατος.**

### **1.2.2. Καρκίνος του μαστού –MCF κύτταρα**

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στο γυναικείο πληθυσμό. Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων που έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς με δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άρρενες δεν είναι ανύπαρκτη αλλά πολύ μικρή. Όσον αφορά στις γυναίκες όλες αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου – όχι, όμως στον ίδιο βαθμό.

Δυστυχώς, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με τα αίτια που προκαλούν καρκίνο του μαστού, παρά το γεγονός ότι έχουν εντοπιστεί αρκετοί παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία (ο καρκίνος του μαστού μπορεί να προκύψει σε οποιαδήποτε ηλικία μετά την εφηβεία αλλά τα ποσοστά αυξάνονται όσο αυξάνονται και οι ηλικιακές κλίμακες), η κληρονομικότητα, διαταραχές της έμμηνου ρύσης, το αλκοόλ, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών, το ιστορικό καρκίνου, η καθιστική ζωή η ατεκνία κτλ.

Μία από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του καρκίνου του μαστού είναι τα MCF-7 κύτταρα. Πρόκειται για μια καρκινική κυτταρική σειρά που απομονώθηκε το 1970 από μια εξηνταεννιάχρονη καυκάσια γυναίκα η οποία τελικά απεβίωσε από καρκίνο του μαστού (το όνομα τους προέρχεται από το ινστιτούτο που ανακαλύφθηκαν το Michigan Cancer Foundation).



**Εικόνα 3: MCF-7 καρκινικά κύτταρα του μαστού.**

### **1.2.3. Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας- κύτταρα HeLa**

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο δεύτερος πιο κοινός τύπος καρκίνου στις γυναίκες παγκοσμίως (μετά τον καρκίνο του μαστού). Με την εισαγωγή του Pap τεστ, ένα εργαλείο προληπτικού ελέγχου το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση των καρκινικών και προκαρκινικών αλλαγών στον τράχηλο, τα ποσοστά του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας στις ΗΠΑ και σε άλλα αναπτυγμένα κράτη έχουν μειωθεί περίπου κατά 70%. Στα αναπτυσσόμενα κράτη ωστόσο, τα οποία δεν έχουν προγράμματα πρόληψης, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί ακόμα μια πολύ σοβαρή ανησυχία.

Ο τράχηλος είναι το στενότερο τμήμα του κάτω μέρους της γυναικείας μήτρας. Έχοντας διαμόρφωση κώνου, συνδέει το ανώτερο τμήμα της μήτρας με τον κόλπο και αποτελεί το κανάλι μέσω του οποίου θα περάσει το έμβρυο που θα γεννηθεί κατά τον τοκετό. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αναπτύσσεται αργά. Οι πρώιμες προκαρκινικές αλλαγές κάνουν τα κύτταρα που βρίσκονται εσωτερικά ή εξωτερικά του τραχήλου να φαίνονται διαφορετικά από τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Αυτές οι αλλαγές, όταν εμφανίζονται στο κολποτραχηλικό επίχρισμα (τεστ Παπανικολάου) αποκαλούνται «άτυπα κύτταρα». Ωστόσο, τα άτυπα κύτταρα δεν είναι απολύτως ειδικά για μια προκαρκινική κατάσταση καθώς μπορούν να εμφανιστούν προσωρινά και σε λοιμώξεις ή ερεθίσματα του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας. Αν είναι προκαρκινικά, τα άτυπα κύτταρα μπορούν να γίνουν ολοένα και με την πάροδο του χρόνου αλλάζουν συνεχώς μορφολογία και είναι πιο πιθανό να εξελιχθούν σε καρκίνο εάν αφεθούν χωρίς θεραπεία. Στα τεστ Pap, αυτές οι

ενδιάμεσες κυτταρικές αλλαγές ονομάζονται χαμηλού ή υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις. Εάν αυτά τα κύτταρα γίνουν καρκινικά, είναι αρχικά περιορισμένα εντός του επιθηλίου και των βλεννογόνων αδένων του τραχήλου (*in situ*). Χωρίς θεραπεία, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διηθήσουν και να εξαπλωθούν στους υποστηρικτικούς ιστούς του τραχήλου και έχουν το δυναμικό και να εξαπλωθούν και σε άλλα μέρη του σώματος. Περίπου 80-90% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας είναι πλακώδη κυτταρικά καρκινώματα, τα οποία λαμβάνουν χώρα στα επίπεδα πλακώδη κύτταρα τα οποία καλύπτουν το επιθήλιο του εξωτραχήλου. Οι περισσότερες από τις άλλες περιπτώσεις είναι αδενοκαρκινώματα, τα οποία προέρχονται ενδότερα από τα αδενικά κύτταρα που παράγουν την βλέννη στον ενδοτράχηλο. Λίγοι καρκίνοι του τραχήλου είναι μίγματα και των δύο τύπων.

Με έγκαιρη ανίχνευση, ειδικά της ενδοεπιθηλιακής νεοπλαστικής αλλοίωσης και των πρώιμων μορφών του καρκίνου, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι συνήθως εύκολα θεραπεύσιμος. Ωστόσο, αν αφηθεί χωρίς έλεγχο, είναι σχεδόν πάντα μοιραίος. Με την πάροδο του χρόνου, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας μπορεί να εξαπλωθεί (να κάνει μετάσταση) στο υπόλοιπο σώμα της μήτρας, την ουροδόχο κύστη, στο ορθό και στο κοιλιακό τοίχωμα. Τελικά, φτάνει στους λεμφαδένες της πύελου και δημιουργεί μεταστάσεις. Τα καρκινικά κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μπορούν τότε να εισβάλλουν σε άλλα όργανα του σώματος.

Τα HeLa κύτταρα είναι μια σειρά καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας. Είναι η παλαιότερη και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ανθρώπινη κυτταρική σειρά στην επιστημονική έρευνα. Η σειρά προήλθε από κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που ελήφθησαν στις 8 Φεβρουαρίου 1951 από την Henrietta μιας ασθενούς η οποία τελικά πέθανε από καρκίνο στις 4 Οκτωβρίου 1951. Η σειρά των κυττάρων βρέθηκε να είναι εξαιρετικά ανθεκτική και παραγωγική, σε σύγκριση και με άλλες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην έρευνα.



**Εικόνα 4: HeLa καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.**

### **1.3 Αγγειογένεση-VEGF**

#### **1.3.1. Αγγειογένεση**

Τα αγγεία του σώματος στον αυλό τους καλύπτονται σε όλο το μήκος τους από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρτιότητα και στην σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό του αγγειακού τοιχώματος και ο ρόλος τους είναι απαραίτητος για διαδικασίες όπως η μεταφορά αίματος, οξυγόνου και θρεπτικών υλικών στους διάφορους ιστούς. Επειδή τα αγγεία του σώματος είναι επιρρεπή σε διαρροές και αποφράξεις, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν υποστεί έντονη εξελικτική πίεση με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών για την ρύθμιση της πηκτικότητας του αίματος εξασφαλίζοντας την αιμόσταση και την διαπερατότητα των αγγείων. Παράλληλα, όντας η διαχωριστική γραμμή μεταξύ ιστών και έμμορφων αμυντικών κυττάρων του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν αναπτύξει συστήματα μεταφοράς των αμυντικών κυττάρων του οργανισμού από το αίμα στους ιστούς σε περιπτώσεις μόλυνσης από μικροοργανισμούς, συμμετέχοντας στην τοπική άμυνα και τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπλέον, το αγγειακό δίκτυο δείχνει αξιοσημείωτη πλαστικότητα για να ανταποκρίνεται στην δημιουργία νέων αγγείων όταν αυτό είναι απαραίτητο, όπως για παράδειγμα μετά από καταστροφή ιστών.

Οι λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζονται από πληθώρα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από

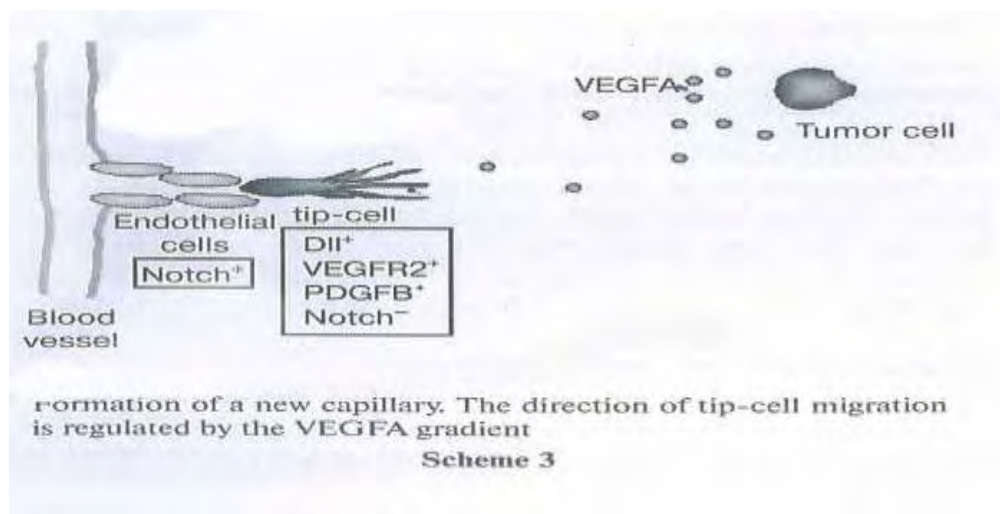
τους παράγοντες αυτούς καθώς και τα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν, συνιστούν ένα πολύπλοκο σύστημα το οποίο απαιτεί εξαιρετικό συντονισμό. Ένα τέτοιο πολύπλοκο σύστημα είναι επιρρεπές σε απορρυθμισμό και αποτελεί την πηγή πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Παθολογικές καταστάσεις των αγγείων όπως θρομβώσεις, αθηρωμάτωση, υπέρταση, αιμορραγίες, αγγειογένεση σε καρκινικούς όγκους καθώς και άλλες αγγειακές ασθένειες αποτελούν αιτίες για πάνω από το 50% των θανάτων στις προηγμένες κοινωνίες.

Η δημιουργία του αγγειακού συστήματος εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Κατά την αρχή της ανάπτυξης του εμβρύου, ξεκινάει ο σχηματισμός του αιμοφόρου αγγειακού συστήματος μέσω της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis). Συγκεκριμένα, μεσοδερμικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε αιμαγγειοβλάστες, προγενήτορες των αιματοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία δημιουργούν τα αιμοφόρα αγγεία. Σε περαιτέρω διαφοροποίηση οι αιμαγγειοβλάστες παράγουν τους αγγειοβλάστες όπου η συσσώρευσή τους οδηγεί στον σχηματισμό νησίδων αίματος. Το στάδιο της αγγειακής διαφοροποίησης ολοκληρώνεται με την συνένωση των νησίδων αίματος η οποία οδηγεί στην εμφάνιση του πρώιμου αγγειακού συμπλέγματος. Είναι ενδιαφέρον ότι ήδη σε αυτό το στάδιο τα τριχοειδή αγγεία εμφανίζουν αρτηριακό ή φλεβικό χαρακτήρα, συνεπώς φαίνεται ότι η κυτταρική εξειδίκευση είναι γενετικά προγραμματισμένη. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αγγειογένεσης (angiogenesis) κατά την οποία ολοκληρώνεται ο σχηματισμός του αγγειακού συμπλέγματος και γίνονται όλοι οι περαιτέρω μετασχηματισμοί του αγγειακού δικτύου όπου νέα αγγεία σχηματίζονται από τα ήδη υπάρχοντα. Έτσι το πρώιμο αγγειακό σύμπλεγμα επεκτείνεται σε τριχοειδή παρακλάδια και τέλος σχηματίζεται το υψηλά οργανωμένο αγγειακό δίκτυο. Κατά την αγγειογένεση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ανάλογα με τον τύπο του αγγείου (αρτηρία, φλέβα, τριχοειδές) τα τοιχώματα των αγγείων ωριμάζουν, καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσελκύουν και συνδέονται στενά με περικύτταρα (στα τριχοειδή) και με πολλαπλό στρώμα μυϊκών κυττάρων (στις αρτηρίες και τις φλέβες) με μια διαδικασία που ονομάζεται αγγειακή μυογένεση (vascular myogenesis) .

Ωστόσο, στους ενήλικες οργανισμούς η αγγειογένεση ξεκινάει από ήδη ώριμα αγγεία. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός νέων αγγείων ξεκινά με την τοπική καταστροφή του τείχους των προϋπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων από ενδοθηλιακές μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας (MPPs), την ενεργοποίηση της αύξησης

των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μετάστασης τους. Η αύξηση και η μετάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων γίνεται κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων π.χ. βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (basic fibroblast growth factor (bFGF)) και αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor (VEGF)). Υπάρχει ένας μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο γίνεται δυνατή η επιλογή συγκεκριμένων ενδοθηλιακών κύτταρων εντός των τριχοειδών αγγείων, από τα οποία ξεκινά η αγγειογενετική επέκταση. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται 'tip cells' και είναι αυτά που αντιδρούν με το συστατικό του VEGF που καθορίζει την κατεύθυνση της μετακίνησης τους, ώστε να κινούνται προς το αγγείο που σχηματίζεται. Επιπλέον, ενεργοποιούν απεκκριμένες ή εξωκυτταρικές πρωτεΐνες για την μερική καταστροφή της βασικής μεμβράνης. Υπό την επίδραση του ίδιου αυξητικού παράγοντα, του VEGF, τα υπόλοιπα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνονται και δημιουργούν σωληνοειδείς δομές όπου με βάση αυτές τις δομές τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων σχηματίζονται (εικόνα 5). Στους ενήλικες, ο σχηματισμός και η αύξηση των νέων αγγείων βρίσκονται υπό αυστηρό έλεγχο. Αυτές οι διαδικασίες ενεργοποιούνται μόνο κάτω από αυστηρές συνθήκες όπως η επούλωση πληγών. Η αυστηρή ρύθμιση του συστήματος και η ισορροπημένη λειτουργία είναι πολύ σημαντικές για τον οργανισμό, διότι και ο υπερβολικός σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων και η ανεπαρκής ανάπτυξη των αγγείων οδηγούν σε σοβαρές ασθένειες. Για παράδειγμα, υπερβολική αγγειακή ανάπτυξη και δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων παρατηρείται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, την διαβητική ρετινοπάθεια καθώς και στον σχηματισμό καρκινικών όγκων. Ιδιαίτερα, η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του όγκου. Σε ένα αυξανόμενο όγκο, όπως και στους άλλους ιστούς, πρέπει να τους παρέχεται οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά έτσι ώστε να διατηρήσουν την ζωτική τους λειτουργία. Είναι γνωστό ότι χωρίς παροχή αίματος οι διαστάσεις του όγκου δεν ξεπερνούν τα 2-3 mm<sup>3</sup> εξαιτίας της υποξίας που οδηγεί στον θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό υπάρχουν μηχανισμοί που ενεργοποιούν την αγγειογένεση στους καρκινικούς όγκους. Κατά συνέπεια, μια από τις βασικές στρατηγικές της καρκινικής χημειοπροστασίας και χημειοθεραπείας είναι η αναστολή της αγγειογένεσης. Στην περίπτωση αυτή, είναι πιο πιθανόν η χημειοπροστασία να είναι αποτελεσματική στα αρχικά στάδια, όπου η αύξηση του καρκινικού όγκου είναι περισσότερο εξαρτώμενη από την αγγειογένεση (Folkman και συν., 1995).





**Εικόνα 5:** Απεικόνιση σχηματισμού τριχοειδούς αγγείου.

### 1.3.2. VEGF: Βασικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μορίων είναι γνωστό ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως θετικοί ρυθμιστές της αγγειογένεσης (π.χ. Fibroblast growth factors FGFa και FGFb, transforming growth factors TGFa και TGFb, hepatocyte growth factors HGF, tumor necrosis factor TNF), δεν είναι όλοι όμως αυτοί οι παράγοντες ικανοί να επηρεάσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το πιο κρίσιμο γεγονός στη ρύθμιση της αγγειογένεσης είναι το μονοπάτι μεταγωγής σήματος στο οποίο εμπλέκεται ο VEGF.

Σε *in vitro* συνθήκες, ο VEGF προκαλεί την αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αρτηρίες, φλέβες και αγγεία της λέμφου με απευθείας επίδραση σε αυτά. Επίσης, σε *in vitro* πειράματα, ο VEGF αναστέλλει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από έλλειψη ορού. Έχει δειχθεί ότι ο VEGF επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι ο VEGF είναι ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης σε μεγάλο αριθμό πειραμάτων *in vivo*. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό ορισμένων ισομορφών του VEGF είναι η ικανότητα τους να προσδέουν την ηπαρίνη επειδή αυτό ορίζει αν η πρωτεΐνη θα συσσωρευθεί στο

εξωκυτταρικό στρώμα ή θα απελευθερωθεί και θα είναι προσιτή για αλληλεπίδραση με τα κύτταρα προκειμένου να ασκήσει την αντι-αγγειογενετική της δράση.

Οι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας VEGF προκαλούν τις βιολογικές επιδράσεις τους μέσω αλληλοεπίδρασης με υποδοχείς που εντοπίζονται στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Υπάρχουν τρεις υποδοχείς των VEGF : VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR-2 (fetal liver kinase-1), και VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase-4) οι οποίοι εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Και οι τρεις υποδοχείς είναι κινάσες της τυροσίνης που αυτό-φωσφορυλιώνονται κατά τη σύνδεση με το VEGF. Ο VEGFR-1 έχει υψηλή τάση πρόσδεσης στον VEGF αλλά μειωμένη ικανότητα σηματοδότησης οπότε αποτελεί και αρνητικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης. Ο VEGFR-2 εμπλέκεται απευθείας στην σηματοδότηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε μιτωτικές διαιρέσεις. Ο VEGFR-3 αρχικά εκφράζεται σε λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα και εμπλέκεται στην αγγειακή ανάπτυξη που προκαλείται από την υποξία. Η ενεργοποίηση των VEGFs οδηγεί στην προσέλκυση σηματοδοτικών μορίων όπως κινασών, προκαλώντας μονοπάτια μεταγωγής σήματος που προάγουν τη μεταγραφή γονιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούνται για την αγγειογένεση.

Επίσης, η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από υποξαιμία, από σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων, από κυτοκίνες και από τη διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ υπερέκφραση του VEGF συμβαίνει σε πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Η αναστολή της αγγειογένεσης είναι μια θεραπευτική προσέγγιση έναντι του καρκίνου. Για παράδειγμα, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αντισώματα που εξουδετερώνουν το VEGF ή με αντισώματα εξουδετέρωσης που μπλοκάρουν τη λειτουργία των υποδοχέων του VEGF.

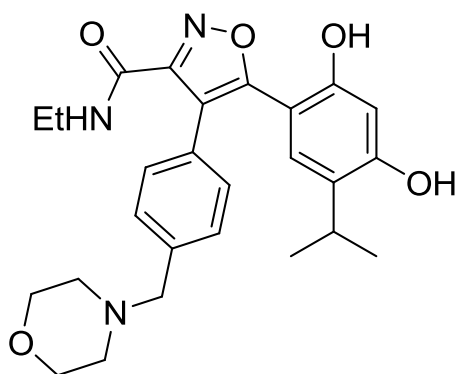
## 1.4 Ετεροκυκλικές Συνθετικές Οργανικές Ουσίες

### *Καινοτόμες Ισοξαζολικές Ενώσεις*

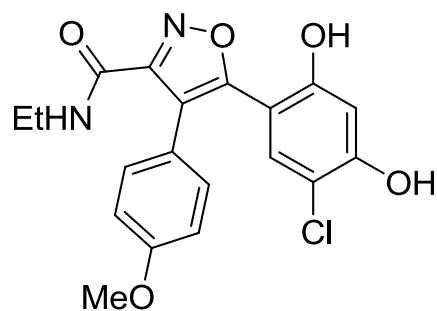
Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας ποικιλία μορίων που περιλαμβάνουν ισοξαζολικούς δακτυλίους σχεδιάστηκαν, παρασκευάστηκαν και διερευνήθηκαν για πιθανή αντικαρκινική και αντι-αγγειογενετική δράση (Gajewski et al., 2009). Έτσι, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν κάποια καινούρια ισοξαζολικά παράγωγα σαν υποθετικά αντι-αγγειογενετικά συστατικά. Η λογική για το σχεδιασμό αυτών των ενώσεων ήταν να συνδυάσουν σε ένα μόνο μόριο το φαρμακευτικό ισοξαζολικό δακτύλιο με ένα άλκυλο-φαίνυλο υποκατάστατο δακτύλιο.

Από τη πληθώρα των αζο-ετεροκυκλικών ενώσεων οι ενώσεις πυροζόλη και ισοξαζόλη συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν σαν αναστολείς των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι οποίες εμπλέκονται στα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης της αγγειογένεσης. Ανάμεσα τους οι NVP-AUY922 και NVP-AUY922 (εικόνα 6), εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αναστολής. Επίσης, πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι ο NVP-AUY922 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση και τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ η αντιαγγειογενετική τους δραστηριότητα εκδηλώνεται με μειωμένη πυκνότητα μικροαγγείων σε καρκινικούς όγκους που επάγονται με τη μεταμόσχευση καρκινικών κυττάρων σε πειραματόζωα. Επιπλέον, ο NVP-AUY922 παρουσίασε σημαντική αντικαρκινική δράση σε προκλινικά μοντέλα καρκίνου του μαστού με αποτέλεσμα να εξεταστεί και στη φάση 1 των κλινικών δοκιμών.

Για να ενισχυθεί η αντι-αγγειογενετική δράση των ισοξαζολικών ενώσεων σχεδιάστηκαν μικρά ισοξαζολικά παράγωγα. Η σύνθεσή τους βασίστηκε στη σύνθεση των παρεμφερών πυραζολίων από τις 1,3 διακετόνες με τη προσθήκη υδραζίνης ή παραγώγων αυτής.

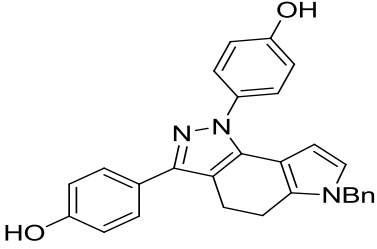
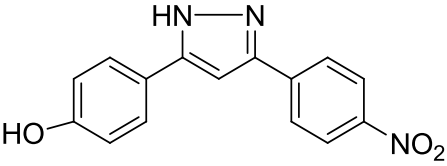
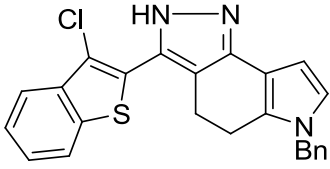
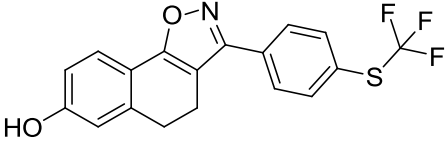
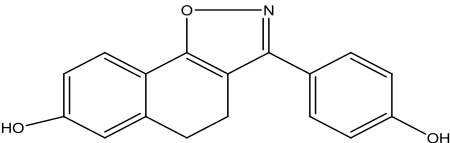


**VER-50589**



**NVP-AUY922**  
**VER-52296**

Εικόνα 6. Χημικές δομές των ισοξαζολικών ενώσεων VER-50589 και NVP-AUY922 που αναστέλλουν την HSP90.

STRUCTURE	CODE	M.W.
	<b>L24</b>	433.50
	<b>L17</b>	281.27
	<b>L39</b>	415.94
	<b>L45</b>	363.35
	<b>L23</b>	279.29

**Πίνακας 1:** Οι πέντε συνθετικές ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις. Οι τρεις πρώτες (L17, L24, L39) είναι πυροξαζολικές ενώσεις, ενώ οι δύο τελευταίες (L23, L45) είναι ισοξαζολικές.

### **1.5 Σκοπός του πειράματος**

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης πέντε συνθετικών ετεροκυκλικών οργανικών ενώσεων, τριών πυροξαζολικών (L17, L24, L39) και δύο ισαξαζολικών (L23, L45). Συγκεκριμένα στο πρώτο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η επίδραση τους στην κυτταρική αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2) και καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7) με τη μέθοδο ΧΤΤ.

Κατά το δεύτερο τμήμα της εργασίας εξετάστηκε η επίδραση αυτών των πέντε ενώσεων στην αγγειογένεση. Χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa), όπου με την μέθοδο της ELISA υπολογίστηκε η ικανότητα των ενώσεων στην αναστολή της έκκρισης του VEGF.

## **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1ΥΛΙΚΑ**

#### **2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια**

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

#### **2.1.2. Θρεπτικά υλικά**

Για τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2 και HeLa χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM high glucose) της εταιρείας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum;) της εταιρείας Biochrom (M.B.). Για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης 0,25% (Gibco).

#### **2.1.3. Καλλιέργεια των καρκινικών κυτταρικών σειρών HepG2, HeLa, MCF-7**

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 καθώς και τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας και του μαστού καλλιεργήθηκαν σε 75-cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10 mL) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης (100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml) (Gibco BRL) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να είναι γεμάτη με κύτταρα στο 80%. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αποκόλληση των κυττάρων με 1 mL τρυψίνης 0,25%. Η επώαση στην τρυψίνη διαρκούσε 7 min στους 37°C και ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5 mL) εμπλουτισμένο με 10% FBS. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

## 2.2. Μέθοδοι

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

#### Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των 5 ετεροκυκλικών συνθετικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή και έχει ένα πορτοκαλί χρώμα το οποίο απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο. Η αύξηση στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων οδηγεί στον αυξημένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και κατά συνέπεια σε αυξημένη απορρόφηση.

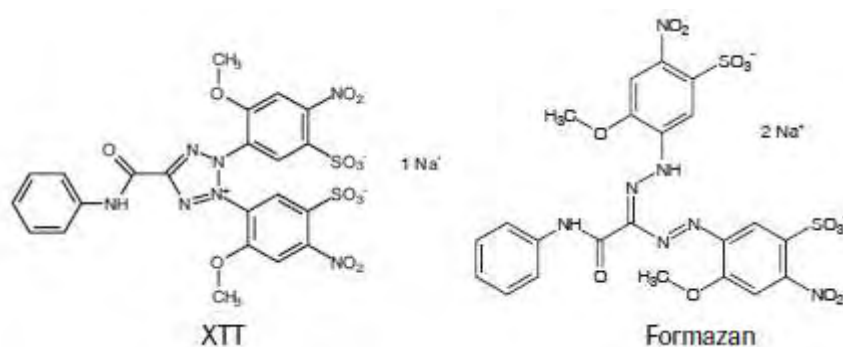
#### Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των HepG2 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος ή των φυτικών πολυφαινόλων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες) 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 μείγμα του XTT/reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1). Η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν την χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, που περιείχαν μόνο ηπατικά κύτταρα. Λόγω της διάλυσης των πολυφαινόλικών μορίων σε διάλυμα DMSO, οι αρνητικοί μάρτυρες για τις φυτικές πολυφαινόλες περιείχαν DMSO σε μέγιστη συγκέντρωση 0,8%. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρες που περιείχαν 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:

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



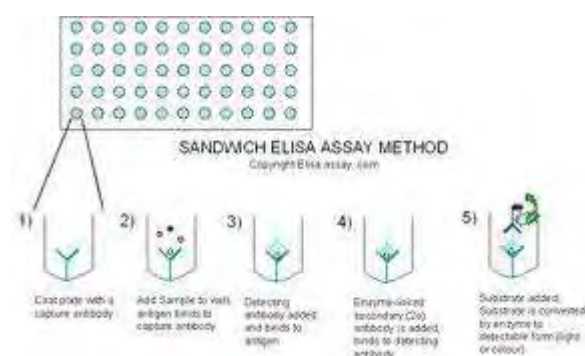
**Εικόνα 7:** Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό formazan από ζωντανά κύτταρα.

## 2.2.2 Προσδιορισμός της αναστολής της έκκρισης του VEGF στα κύτταρα HeLa με τη μέθοδο της ELISA.

### Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της αναστολής της έκκρισης του VEGF σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας λόγω προσθήκης των 5 ετεροκυκλικών συνθετικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το Quantikine ELISA kit VEGF της εταιρείας R&D.

Η τεχνική λέγεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοροφητική μέτρηση (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ELISA. Η διπλή ELISA που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, γνωστή και ως ELISA sandwich επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του αντιγόνου. Αντισώματα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προσκολλώνται στον πυθμένα του πλακιδίου. Στη συνέχεια, το προς εξέταση δείγμα, προστίθεται στο πλακίδιο και εφόσον περιέχει το αντιγόνο, δεσμεύεται με το αντίσωμα του πλακιδίου. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο διαφορετικό αντίσωμα για το ίδιο αντιγόνο προστίθεται στο πλακίδιο. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένζυμο το οποίο καταλύει μια αντίδραση που παράγει ένα χρωμοφόρο προϊόν. Αν τελικά στο υπό εξέταση δείγμα υπάρχει αντιγόνο τότε θα υπάρξει και δέσμευση του συμπλόκου αντίσωμα1-αντιγόνο-αντίσωμα2-ένζυμο και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας το χρωμοφόρο προϊόν. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη δέσμευση και συνεπώς με τη ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα.



**Εικόνα 8:** Αρχή της πειραματικής μεθόδου ELISA sandwich .

### Πειραματική Διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, έγινε μέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια προσθέτουμε 300.000 κύτταρα/θέση σε ένα τριβλίο με 6 θέσεις. Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για μια μέρα στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε τις συνθετικές ετεροκυκλικές ενώσεις σε δύο συγκεντρώσεις σε όγκο 200μl και προσθέτουμε και 1800μl μέσο με 5% FBS (200μl ένωσης + 1800ml 5% FBS medium). Η μία συγκέντρωση ήταν παραπλήσια με τη τιμή IC<sub>50</sub> της κάθε ένωσης στα κύτταρα HeLa, και η δεύτερη ίση με το μισό της τιμής IC<sub>50</sub>. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, που περιείχαν μόνο καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας σε θρεπτικό υλικό με 5% FBS. Λόγω της διάλυσης των ενώσεων σε διάλυμα DMSO, οι αρνητικοί μάρτυρες περιείχαν DMSO σε μέγιστη συγκέντρωση 0,1%. Η διάλυση της ένωσης L23 έγινε σε μεθανόλη με συγκέντρωση 1% και έτσι και ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε θρεπτικό υλικό με 5% FBS και 1% μεθανόλη. Σημειώνεται ότι κάθε ουσία μελετήθηκε τουλάχιστον σε δυο διαφορετικά πειράματα. Επίσης, σε κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξετάζονταν δύο φορές. Επωάζουμε για 16 ώρες τα κύτταρα με την ένωση. Την τρίτη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από κάθε τριβλίο κάνουμε φυγοκέντρηση 15.000rpm 30min 4°C. Παίρνουμε 200μl και τα προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι της ELISA πλάκας αφού πρώτα έχουμε προσθέσει το αντιδραστήριο RD1W. Επωάζουμε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με wash buffer. Προσθέτουμε το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα (200μl/well) και επωάζουμε για άλλες 2 ώρες στις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις πλύσεις και στα πηγαδάκια προσθέσαμε 200μl Substrate Solution. Καλύψαμε τη πλάκα με αλουμινόχαρτο και επώαστηκε για 20 λεπτά. Τέλος προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι 50μl stop solution και έγινε φωτομέτρηση στα 450nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) με τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek) .

Σημειώνεται ότι για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων έγινε μέτρηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford έτσι ώστε η ποσότητα του VEGF σε κάθε δείγμα να υπολογίζεται ανά mg πρωτεΐνης.

### **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο ANOVA με το πρόγραμμα SPSS 13.0.

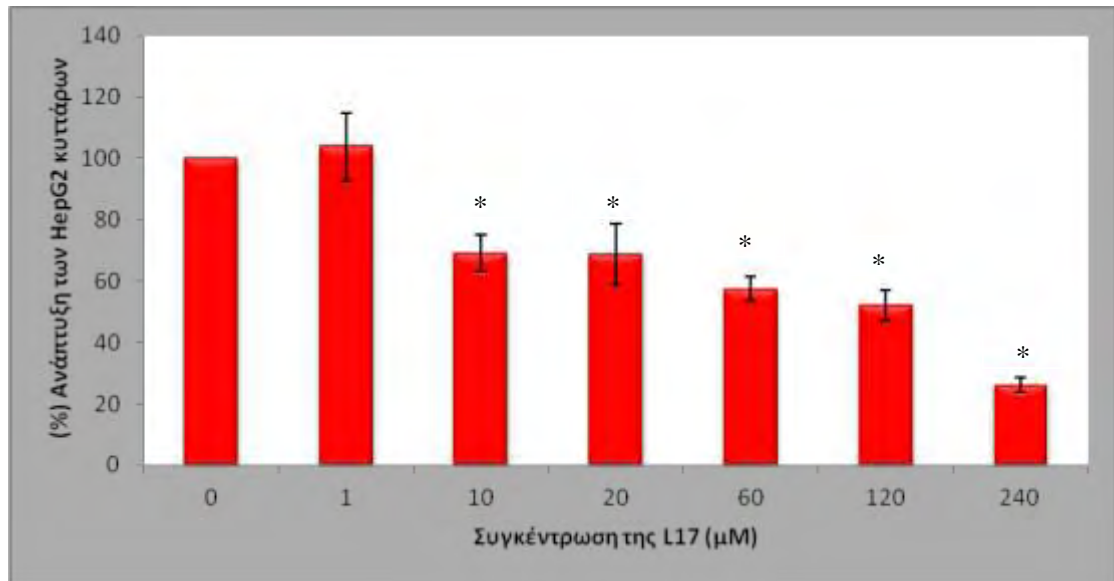
### **3.Αποτελέσματα**

Στο πρώτο μέρος του πειράματος μελετήθηκαν πέντε συνθετικές ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις, ως προς την επίδραση τους στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη καρκινικών ηπατοκυττάρων HepG2 και καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η XTT μέθοδος. Για κάθε ένωση υπολογίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub>, που δείχνει τη συγκέντρωση στην οποία αναστέλλεται η αύξηση των κυττάρων κατά 50%. Όσο πιο μεγάλη είναι η μείωση της ανάπτυξης παρουσία της κάθε ουσίας τόσο πιο μικρή είναι η IC<sub>50</sub> και συνεπώς τόσο πιο δραστική είναι η ουσία.

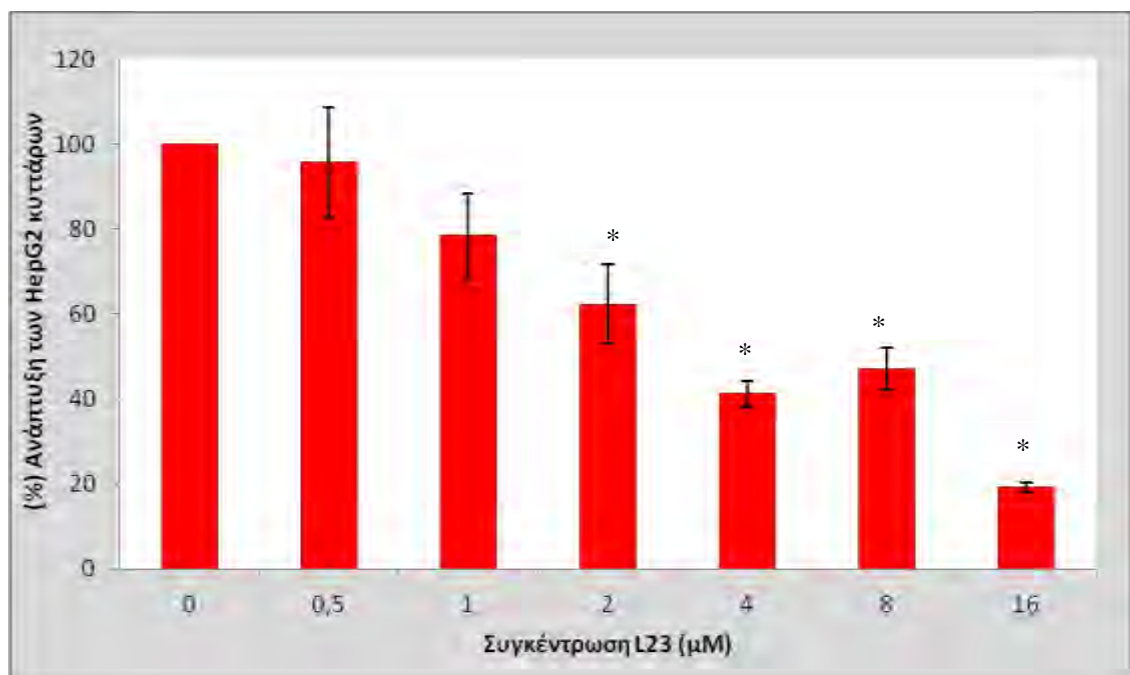
Στα ηπατικά κύτταρα HepG2 το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> των ενώσεων κυμαινότανε από 3 έως 140 μM. Πιο ισχυρή αποδείχθηκε η ένωση L23 με τιμή IC<sub>50</sub> 3 μM. Η σειρά δραστικότητας των πέντε ουσιών είναι L23>L24>L39>L45>L17.

Στα καρκινικά κύτταρα του μαστού το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> των ενώσεων κυμαινότανε από 5 έως 140μM. Πιο ισχυρή αποδείχθηκε και σε αυτή τη καρκινική σειρά η L23 με τιμή IC<sub>50</sub> 5 μM. Η σειρά δραστικότητας είναι ίδια με τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος, δηλαδή L23>L24>L39>L45>L17.

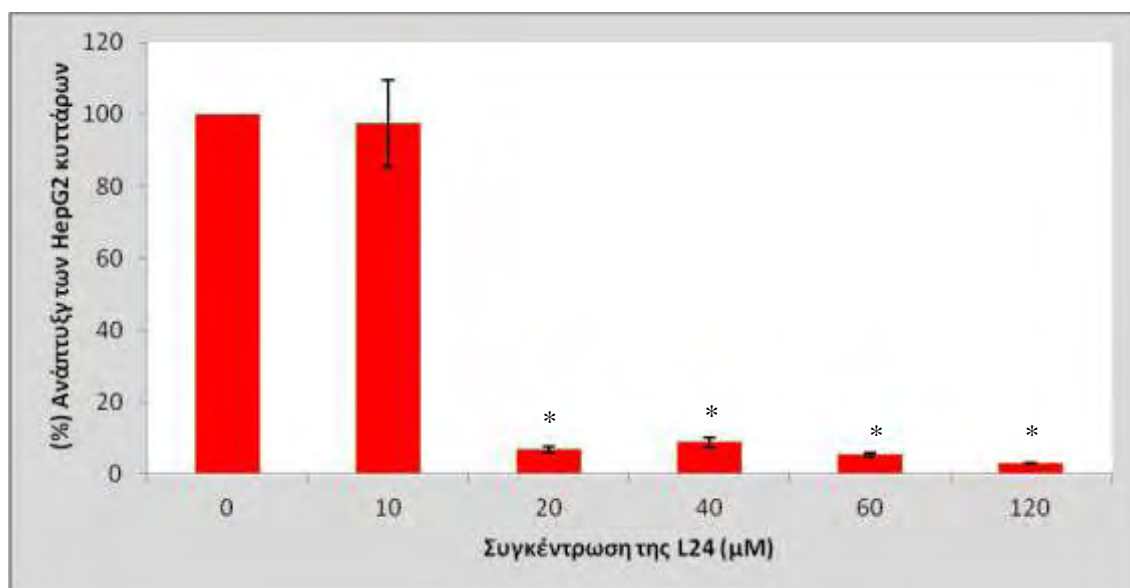
Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για τη κάθε χημική ουσία ξεχωριστά σε μορφή διαγράμματος και για τις δύο καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν.



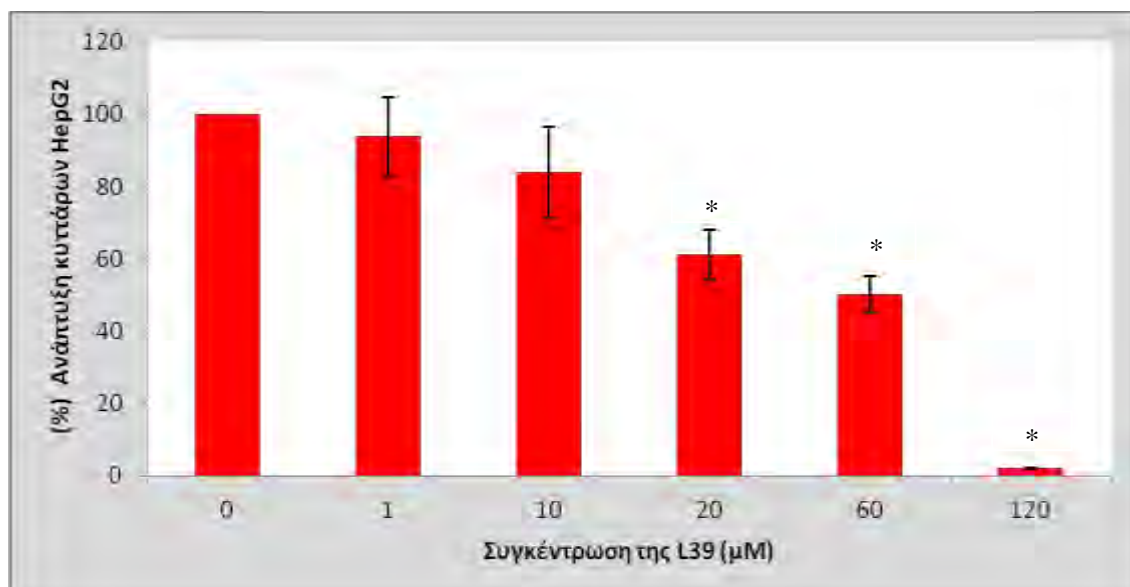
Διάγραμμα1: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L17 στην % ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



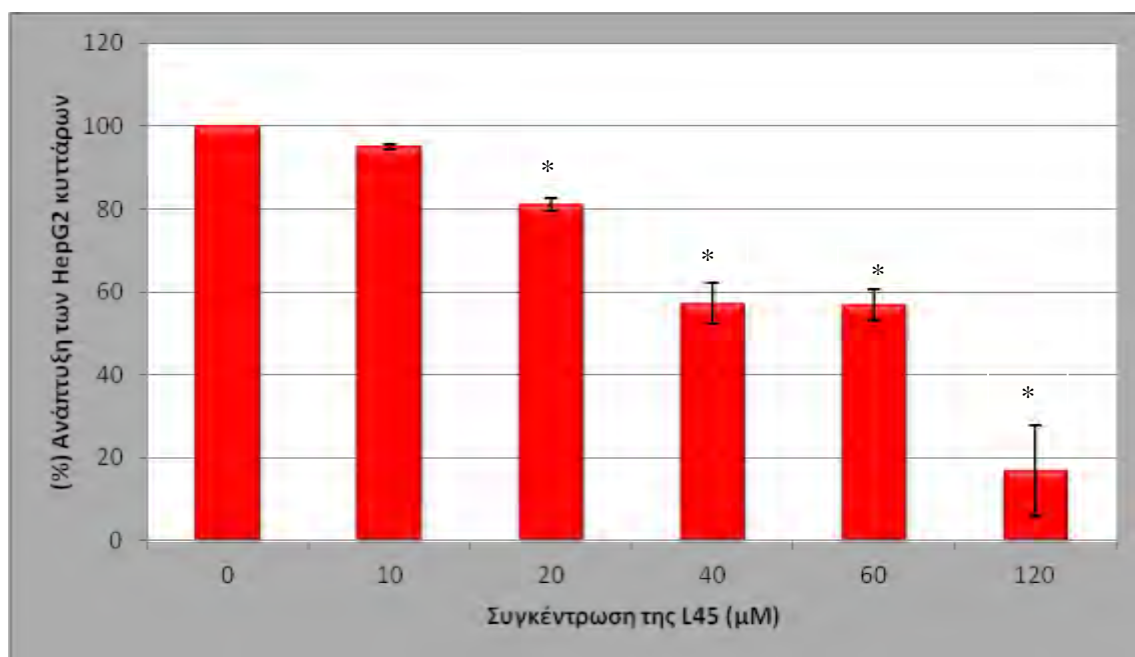
Διάγραμμα2: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L23 στην % ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Διάγραμμα3: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L24 στην % ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.

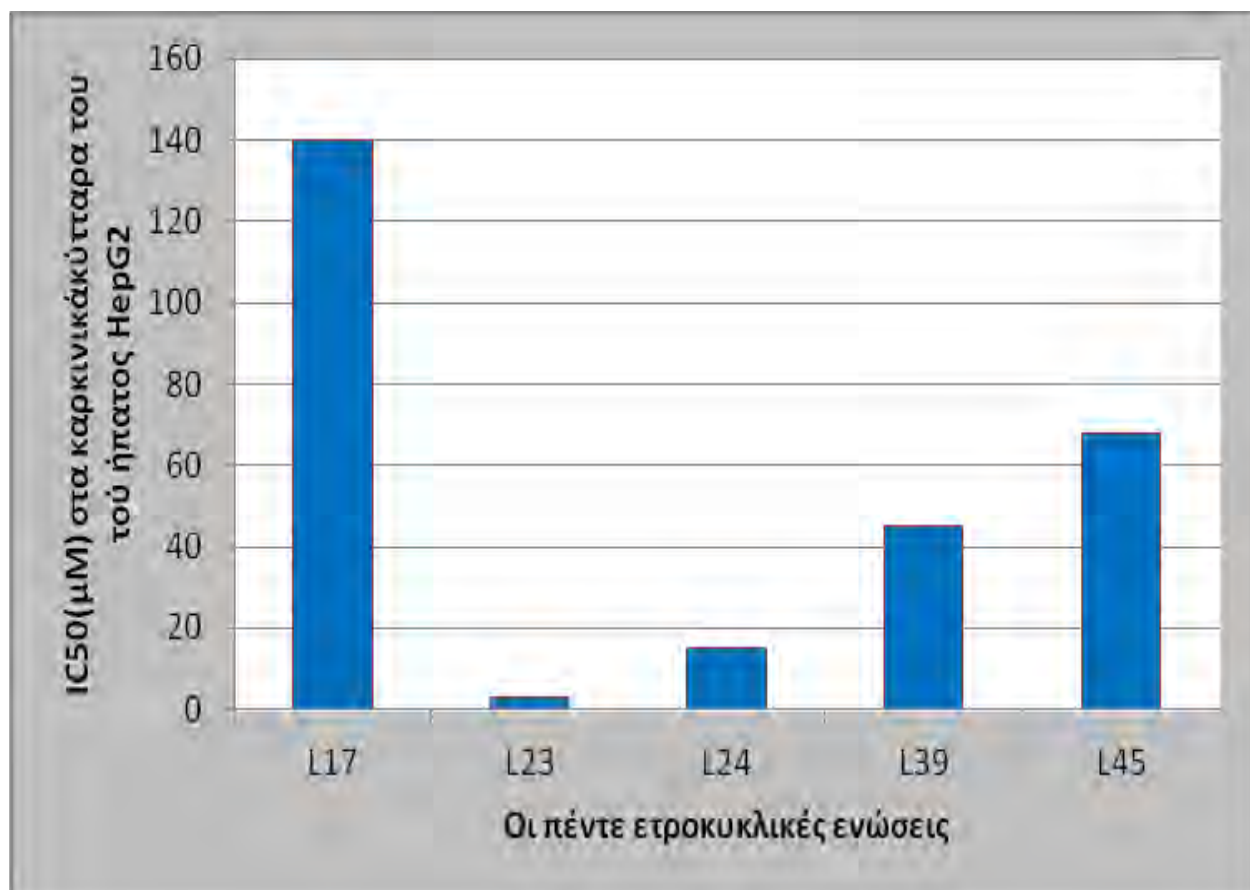


Διάγραμμα4: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L39 στην % ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.

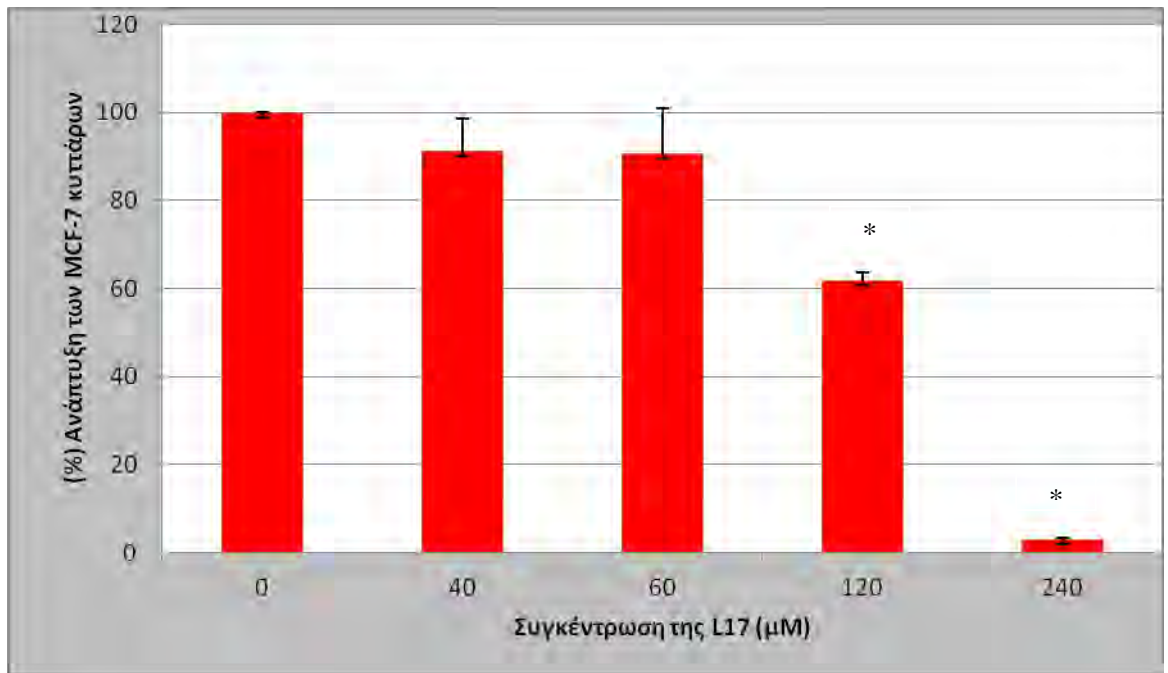


Διάγραμμα5: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L45 στην % ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.

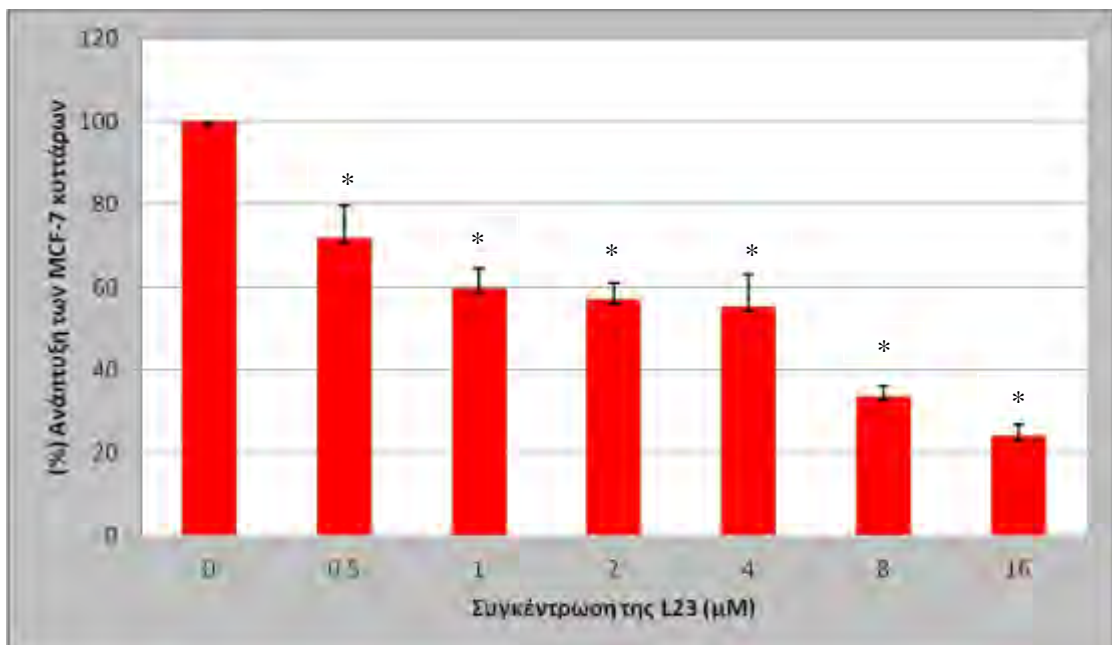




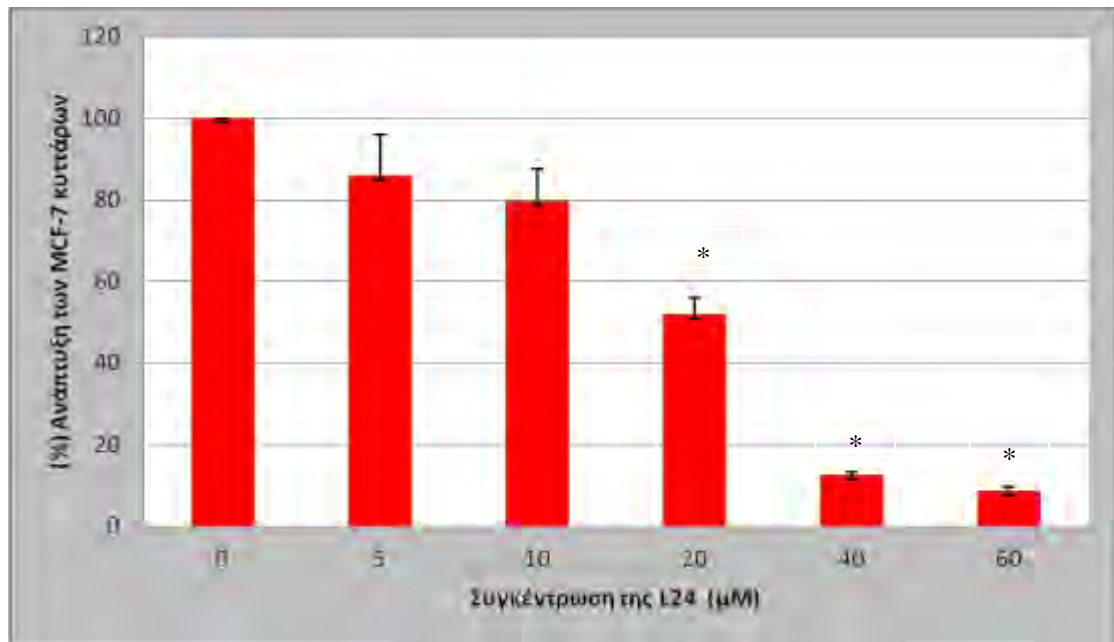
Διάγραμμα 6: Συγκεντρωτικό διάγραμμα όπου απεικονίζεται η IC50 για τις πέντε διαφορετικές ετεροκυκλικές ενώσεις στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2.



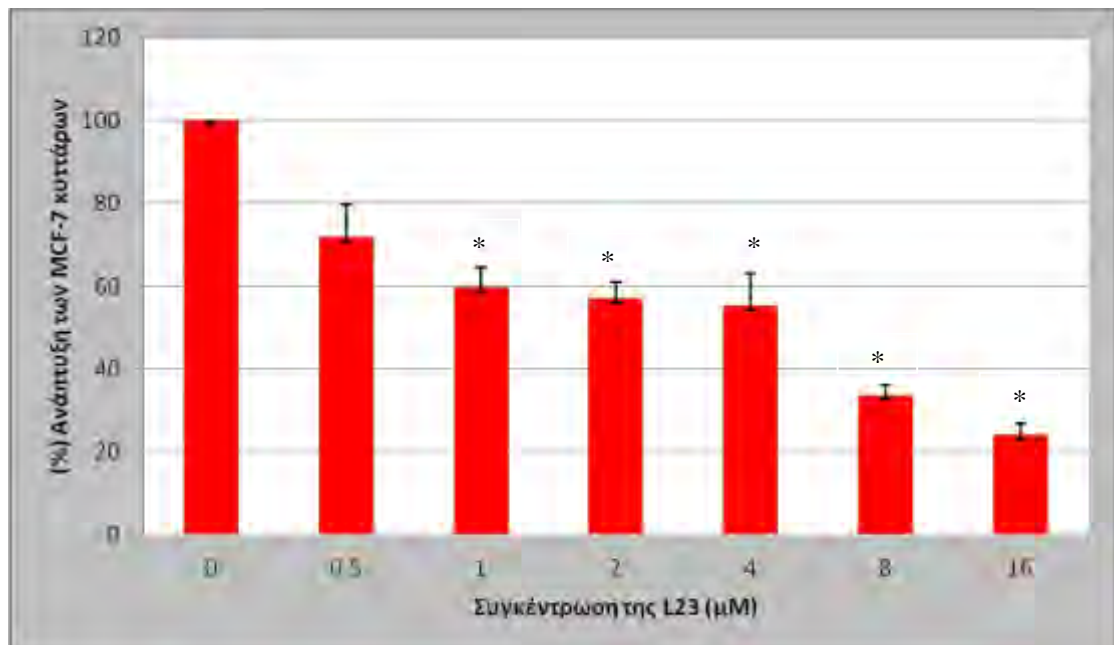
Διάγραμμα7: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L17 στην % ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



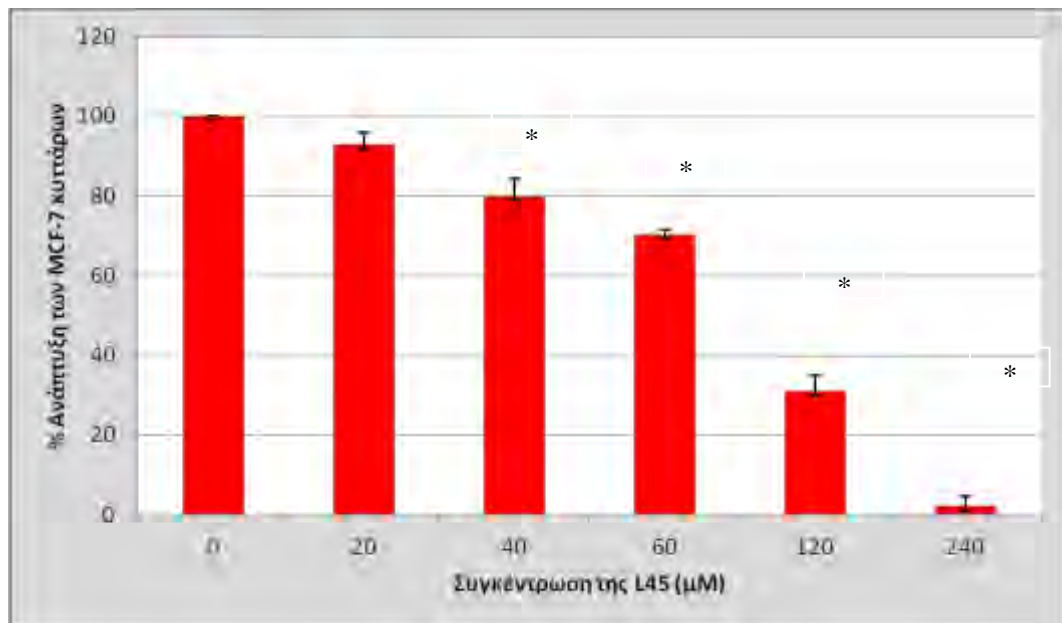
Διάγραμμα8: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L23 στην % ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



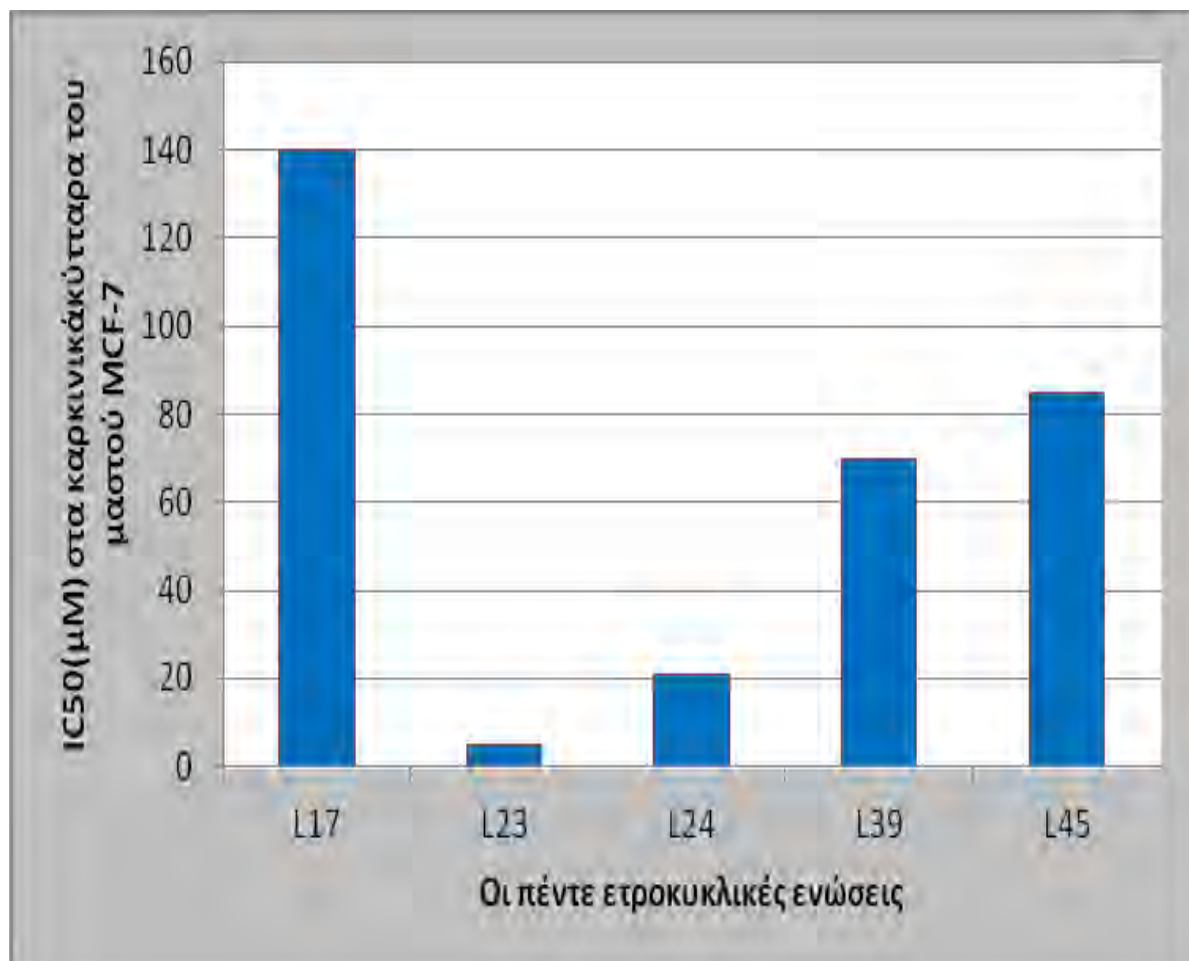
Διάγραμμα9: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L24 στην % ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Διάγραμμα10: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L39 στην % ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



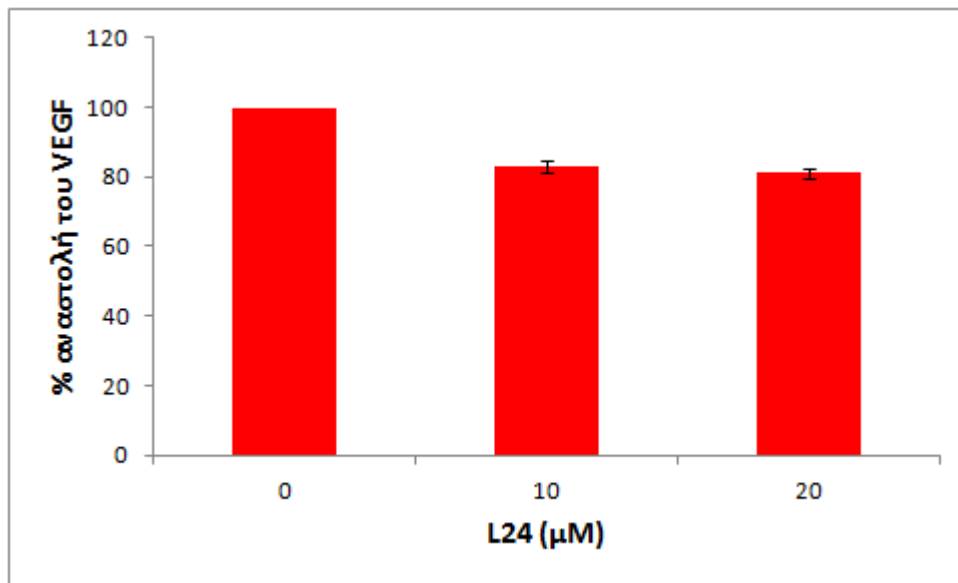
Διάγραμμα11: Επίδραση της ετεροκυκλικής ένωσης L45 στην % ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το μάρτυρα.



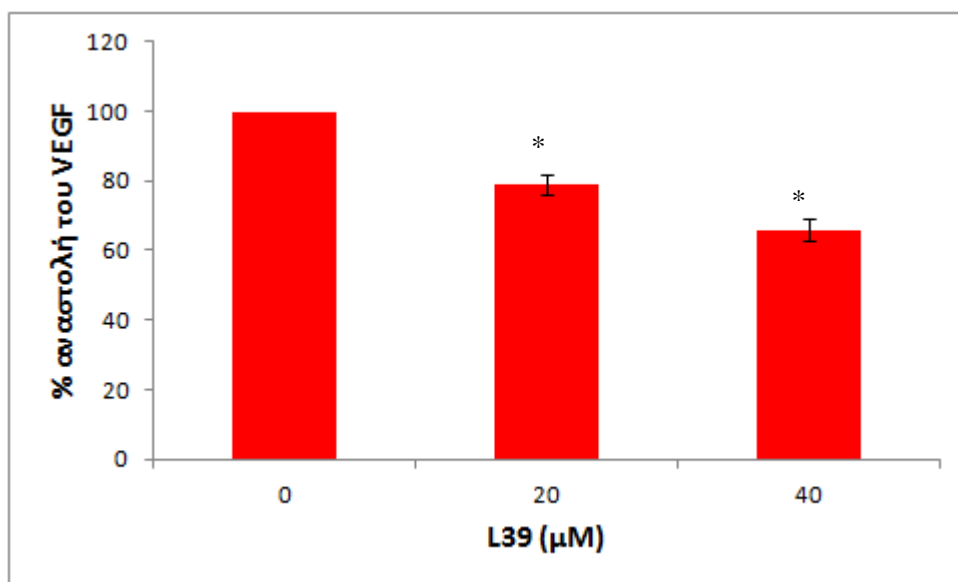
Διάγραμμα 12: Συγκεντρωτικό διάγραμμα όπου απεικονίζεται η IC50 για τις πέντε διαφορετικές ετεροκυκλικές ενώσεις στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7.

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η ικανότητα αυτών των ενώσεων στην αναστολή της έκφρασης του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF με τη μέθοδο της ELISA στα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι η L39 σε συγκέντρωση 20 $\mu$ M και 40 $\mu$ M παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αναστολή της έκφρασης του VEGF κατά 21% και 34% αντίστοιχα. Επίσης, και η L24 παρουσιάζει αναστολή κατά 19% σε συγκέντρωση 20 $\mu$ M, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

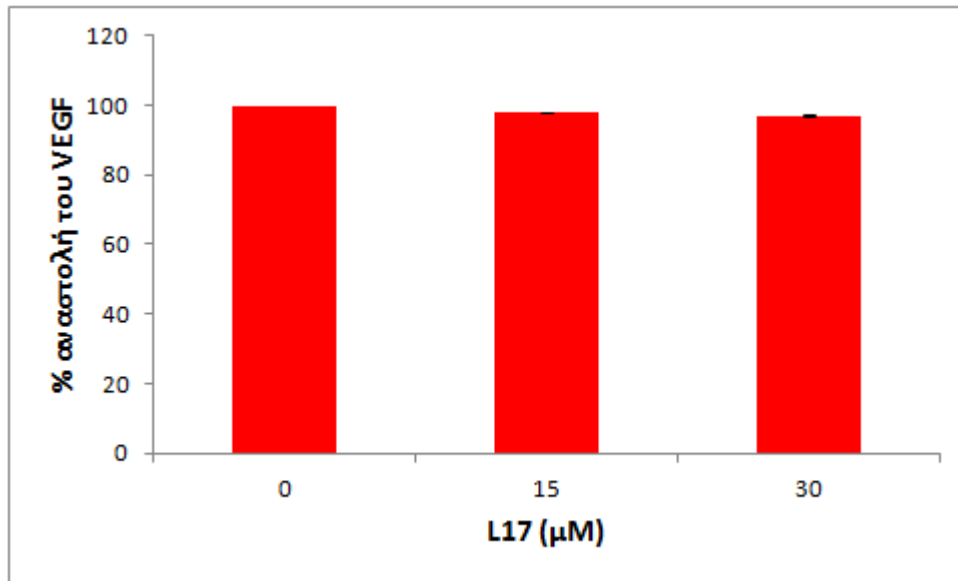
Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της κάθε ουσίας ξεχωριστά όπου απεικονίζεται η επίδρασή τους στην έκφραση του VEGF στα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.



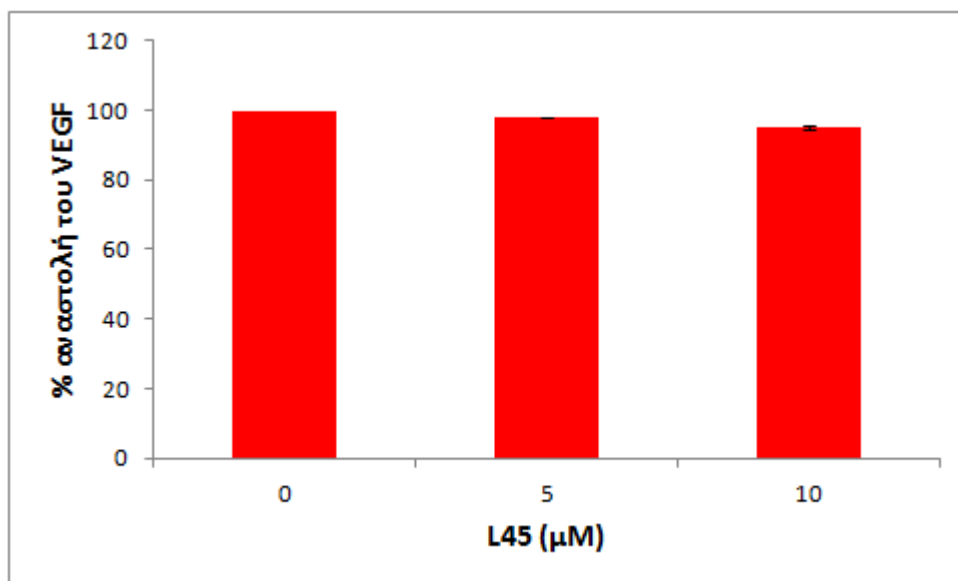
Διάγραμμα 13: Επίδραση της χημικής ένωσης L24 στην έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.



Διάγραμμα 14: Επίδραση της χημικής ένωσης L39 στην έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa. \* $p < 0.05$  σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα.

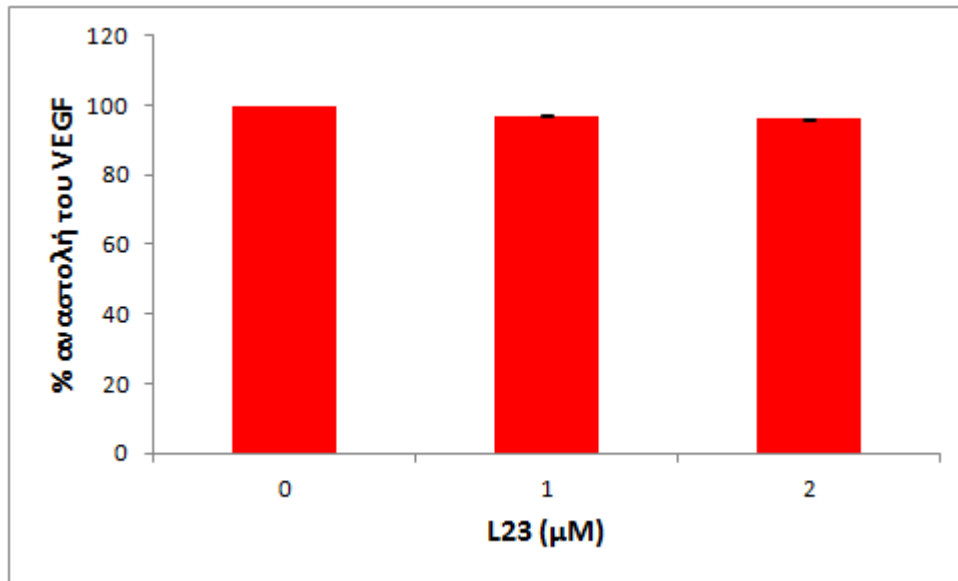


Διάγραμμα 15: Επίδραση της χημικής ένωσης L17 στην έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.



Διάγραμμα 16: Επίδραση της χημικής ένωσης L45 στην έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.





Διάγραμμα 17: Επίδραση της χημικής ένωσης L23 στην έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.

#### **4.Συζήτηση**

Με τον όρο ‘καρκίνος’ αναφερόμαστε σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πρόκειται για ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται και αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Είναι πλέον γνωστό πως η καρκινογενετική διαδικασία αποτελεί μια πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μια εκτεταμένη χρονικά περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης μέχρι την εμφάνιση της νόσου.

Ο καρκίνος του ήπατος είναι από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι αποτελεσματικές καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισης του μετά από θεραπεία. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μία από τις πλέον συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο, πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων μεταξύ του γυναικείου πληθυσμού, ιδιαίτερα στο δυτικό κόσμο. Αποτελεί, επίσης, τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου μεταξύ των Ευρωπαίων γυναικών και την πρώτη μεταξύ καρκινοπαθών. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι μια πολύ επιθετική μορφή καρκίνου με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Και για τις τρεις αυτές μορφές καρκίνου αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή τους ή νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης συνθετικών ετεροκυκλικών οργανικών ενώσεων στην κυτταρική αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2 και του μαστού MCF-7. Επίσης, στο δεύτερο μέρος του πειράματος εξετάστηκε η ικανότητα αυτών των ενώσεων στην αναστολή της αγγειογένεσης μέσω της αναστολής της έκφρασης του VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa.

Συγκεκριμένα στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση των πέντε ετεροκυκλικών συνθετικών οργανικών ενώσεων στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος και του μαστού με τη μέθοδο XTT. Βρέθηκε ότι οι ενώσεις ανέστειλαν σε μικρές συγκεντρώσεις την αύξηση των καρκινικών κυττάρων. Πιο ισχυρή αποδείχτηκε η ένωση L23 με τιμή IC<sub>50</sub> 3μM στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος και 5μM στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Το εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> των

ενώσεων κυμαινόταν από 3 έως 140μM για τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος και από 5 έως 140μM για τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Η σειρά δραστηριότητας για τις πέντε ουσίες είναι L23>L24>L39>L45>L17 και για τις δύο καρκινικές σειρές. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν την ικανότητα των ενώσεων αυτών στην αναστολή της κυτταρικής αύξησης σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες έδειξαν ότι και στα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa η σειρά δραστηριότητας των ουσιών ήταν η ίδια όπως και στα κύτταρα HepG2 και MCF-7. Η πιο ισχυρή είναι και σε αυτή τη περίπτωση η ένωση L23 με τιμή για την IC50 3μM και το εύρος των τιμών κυμαινόταν από 3,3 έως 55 μM.

Επιπλέον, άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν την αύξηση διαφόρων τύπων ενδοθηλιακών κυττάρων το οποίο υποδεικνύει μια πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση η οποία αποτελεί μια σημαντική στρατηγική για την αναστολή της καρκινογενετικής διαδικασίας. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι οι ενώσεις L23, L24, L39, και L45 αποδείχτηκε να αναστέλλουν *in vitro* το σχηματισμό μικροσωληνίσκων (που αποτελούν δείκτη αγγειογένεσης) από ενδοθηλιακά κύτταρα στο Tube formation assay. Έτσι, στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η ικανότητα των πέντε αυτών ενώσεων να αναστέλλουν την έκκριση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα VEGF σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa με τη μέθοδο της ELISA. Ο VEGF είναι ο σημαντικότερος παράγοντας στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χημική ένωση L39 ανέστειλε την έκκριση του VEGF σε ποσοστό 34% και 21% στις συγκεντρώσεις 40μM και 20μM αντίστοιχα. Επίσης η ένωση L24 παρουσιάζει μια τάση για αναστολή της έκκρισης του VEGF κατά 17% και 19% στις συγκεντρώσεις 10μM και 20μM αντίστοιχα, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Έτσι, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι ενώσεις L24 και L39 έχουν πιθανή αντι-αγγειογενετική δράση μέσω αναστολής του VEGF. Ωστόσο, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διαπιστωθεί εάν οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν την έκφραση του VEGF σε μεταγραφικό ή μεταφραστικό επίπεδο ή απλώς την έκκρισή του.

## **5.Βιβλιογραφία**

### *Ελληνική Βιβλιογραφία*

- Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρις 2003.
- Ντόζη-Βασιλειάδου Ι, Μουρελάτος Δ. Κυτταρογενετικές μέθοδοι για τη βελτίωση κ 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 Κυριακίδ Θεσσαλονίκη, 1992.
- Τσακόπουλος Μ, Vander A, Sherman J, Luciano D. Φυσιολογία του Ανθρώπου Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη: Αθήνα, 2001.

### *Ξενόγλωσση βιβλιογραφία*

- Bailey GS, Hendricks JD, Shelton DW, Nixon JE, Pawlowski NE: Enhancement of carcinogenesis by the natural anticarcinogen indole-3-carbinol (1987) J Natl Cancer Inst , 78: 931-934
- Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R: Cell death by apoptosis and its protective role against disease (1992) Trends Pharmacol Sci, 13: 245-251
- Cairns J : Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, Nature, 255: 197-200
- Cesarone CF, Scovassi AI, Scarabelli L, Izzo R, Orunesu M, Bertazzoni U: Depletion of adenosine diphosphate-ribosyl transferase activity in rat liver during exposure to N-2-acetylaminofluorene: effect of thiols (1988) Cancer Res, 48: 3581-3585
- De Flora S, Ramel C: Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) Basic Life Sci, 52: 461-462

- Farzaneh F, Panayotou GN, Bowler LD, Hardas BD, Broom T, Walther C, Shall S: ADP-ribosylation is involved in the integration of foreign DNA into the mammalian cell genome (1988) *Nucleic Acid Res*, 16: 1319-1326
- Fialkow PJ : Clonal origin of human tumors, 1979, *Annu Rev Med*, 30: 135-143
- Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, *Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki*, 16: 183-184
- Gajewski MP, Beall H, Schnieder M, Stranahan SM, Mosher MD, Rider KC, Natale NR. Bis-anthracenyl isoxazolyl amides have enhanced anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 19(15):4067-9.
- Hartman PE, Shankel DM: Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules (1990) *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182
- 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
- Hill DL, Grubbs CJ: Retinoids and cancer prevention (1992) *Annu Rev Nutr*, 12: 161-181
- Imanishi H, Sakaki YF, Matsumoto K, Watanabe M, Ohta T, Shirasu Y, Tutikawa K: Suppression of 6-TG- resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin (1990) *Mutat Res*, 243: 151-158
- Jordan VC: The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer (1992) *Cancer*, 70: 977-982
- Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, *Jpn J Physiol*, 35: 693-707
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC: Mechanistic considerations in chemopreventive drug development (1994) *J Cell Biochem (Suppl)* 20: 1024
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, Sigman CC: Inhibition of chemical carcinogenesis. In *Chemical induction of Cancer: Modulation and Combination Effects* (Arcos J, Argus M, Woo Y, eds) Boston: Birkhauser Boston, 1997
- Kensler TW, Trush MA, Guyton KZ: Free radicals as targets for cancer chemoprevention: prospects and problems. In *Cellular and Molecular Targets for Chemoprevention* (Steele VH, Stoner GD, Boone CW, Kelloff GJ, eds). Boca Raton, FL:CRC Press, 1992:173-191

- 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
- 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
- Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M, Attali P: Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis (1991) *Gastroenterology*, 101: 635-639
- Loewenstein WR : Junctional intercellular communication and the control of growth, 1979, *Biochim Biophys Acta*, 560: 1-65
- Lowenstein WR: Junctional intercellular communication and the control of growth (1979) *Biochem Biophys Acta*, 560: 1-65
- Marx J: Many gene changes found in cancer, 1989, *Science*, 246: 1386-1388
- Meyn SM, Rossman T, Troll WA: A protease inhibitor blocks SOS functions in *Escherichia Coli*: Antipain prevents lambda repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis and filamentous growth (1977) *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 1152-1156
- 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
- Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi C-I, Desai DH, Amin SG, Chung F-L: Structure activity relationships for inhibition of 4-methylnitrosamino-1-3(pyridyl)-1-dutanone (NNK) lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice (1991) *Cancer Res*, 51: 1846-1850
- Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, *Cancer Res*, 47: 1473-1487
- Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis (1992) *Cancer Metastasis Rev*, 11: 141-148
- Packer JE, Mahood JS, Mora-Arellano VO, Slater TF, Wilson RL, Wolfenden BS: Free radicals and singlet oxygen scavengers: reaction of a peroxy radical with beta-

- carotene, diphenyl furan and 1,4-diazobicyclo (2,2,2)-octane (1981) *Biochem Biophys Res Commun*, 98: 901-906
- Pence BC, Buddingh F, Yang SP: Multiple dietary factors in the enhancement of dimethylhydrazine carcinogenesis: main effect of indole-3-carbinol (1986) *J Natl Cancer Inst*, 77: 269-276
  - 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
  - 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
  - Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor  $\beta$  (1988) *Adv Cancer Res*, 51: 107-145
  - Roebuck BD, Liu Y-L, Rogers AE, Groopman JD, Kensler TW: Protection against aflatoxin B1 induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz): predictive role of molecular dosimetry (1991) *Cancer Res*, 51: 5501-5506
  - Sani BP, Singh RK, Reddy LG, Gaub M-P: Isolation, partial purification and characterization of nuclear retinoid acid receptors from chick skin (1990) *Arch Biochem Biophys*, 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 (1982) *J Am Chem Soc*, 104: 5562-5564
  - Slaga TJ: Overview of tumor promotion in animals (1983) *Environ Health Perspect*, 50: 3-14
  - Stagos D, Amoutzias GD, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis AM, Kouretas D. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food Chem Toxicol*. 2012 50(6):2155-70.
  - Stoner GD, Siglin JC, Morse MA, Desai DH, Amin SG, Kresty LA, Toburen AL, Heffner EM, Francis DJ: Enhancement of esophageal carcinogenesis in male F344 rats by dietary phenyl hexyl isothiocyanate (1995) *Carcinogenesis*, 16: 2473-2476
  - Tanaka T, Mori Y, Morishita Y, Hara A, Ohno T, Kojima T, Mori H: Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats (1990) *Carcinogenesis*, 10: 175-181

- Thompson HJ, Ronan AM: Inhibition of 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary tumorigenesis by a-difluoromethylornithine and retinyl acetate (1983) Proc Am Assoc Cancer Res, 24: 86
- 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
- Wainfain E, Dizik M: Suppression by methionine and choline of onco-fetal patterns of liver t-RNA methyltransferase activities in carcinogen treated rats (1987) Carcinogenesis, 8: 615-617
- Wainfain E, Poirier A: Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression (1992) Cancer Res, 52: 2071-2077
- Wattenberg LW, Loub WD: Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles (1978) Cancer Res, 38: 1410-1413
- Zhang Y, Kensler TW, Cho C-G, Posner GH, Talalay P: Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates (1994) Proc Natl Acad Sci USA, 91: 3147-3150
- Zhang Y, Talalay P, Cho C-G, Posner GH: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure (1992) Proc Natl Acad Sci USA, 89: 2399-2403