



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *LATHYRUS laxiflorus* ΣΤΟΝ  
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ  
ΗΠΑΤΟΣ**



**ΑΚΡΙΒΟΥΛΗ ΖΩΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2011**

Μελέτη της επίδρασης του *Lathyrus laxiflorus* στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση  
καρκινικών κυττάρων του ήπατος.

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

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

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

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

*« Αν οι γνώσεις μας δεν υπηρετούν τον σκοπό της απόλαυσης,  
αν μας ξανακάνουν αφελείς με έναν καινούργιο τρόπο,  
είναι εμπόδιο και παγίδα..»*

*Χόρχε Λουίς Μπόρχες*

*Στον Θοδωρή μου*

## **Ευχαριστίες**

Θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μου.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κ. Στάγκο Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθειά του και τις υποδείξεις του στον τρόπο εργασίας, καθώς και την υποστήριξη που μου παρείχε, τόσο κατά την εκτέλεση του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά τον Θοδωρή μου, τους γονείς μου και την αδερφή μου, για την αγάπη τους και την υποστήριξή τους.

## Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Αιτίες του θεωρούνται διάφορα καρκινογόνα όπως οι ιοί, διάφορα χημικά και η ακτινοβολία καθώς και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι αυθόρμητες μεταλλάξεις. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων, που προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής. Τα εκχυλίσματα από το φυτό *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* είναι πλούσια σε πολυφαινόλες.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης 2 εκχυλισμάτων (υδατικού και μεθανολικού) και 6 καθαρών πολυφαινολικών μορίων (Kaempferol - 3 - o - rhamnoside, Quercetin - 3 - o - rhamnoside, Kaempferol - 3 - o - rutinoside, Quercetin - 3 - o - rutinoside, Caffeic acid και Apigenin - 6 - c - a - L – arabinopyranose - 8 - c - b - D – glucopyranose) του *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus* στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ ο προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης έγινε με τη μέθοδο Cell Death Detection ELISA. Επίσης, εξετάστηκε η ενζυμική δραστηριότητα των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2. Και τα δύο εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* παρουσίασαν αναστολή της αύξησης των καρκινικών ηπατοκυττάρων (HepG2), το υδατικό όμως έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, ειδικότερα στη συγκέντρωση 1600 μg/mL. Επίσης, σε όλα τα μόρια παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής αύξησης στη μεγαλύτερή τους συγκέντρωση πλην του Kaempferol – 3 – O – rutinoside, που δεν έδωσε σημαντική μείωση σε καμία συγκέντρωση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε απόπτωση και από τα δύο εκχυλίσματα, με το υδατικό να έχει ισχυρότερη δράση, προκαλώντας στη συγκέντρωση των 1600 μg/mL αύξηση της απόπτωσης κατά 250% έναντι του μεθανολικού με 200 %, αποδεικνύοντας ότι η αναστολή της κυτταρικής αύξησης από τα εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* οφείλεται στην πρόκληση απόπτωσης, που θεωρείται σημαντικός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός ενάντια στον καρκίνο. Τέλος, το μεθανολικό εκχύλισμα είχε ελάχιστη έως σχεδόν μηδαμινή επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2. Οι παρατηρούμενες επιδράσεις του *Lathyrus laxiflorus* στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 το καθιστούν ενδιαφέρον χημειοπροστατευτικό παράγοντα.

## Abstract

Cancer is one of the most frequent causes of death in modern societies. Cancer's causes are various carcinogens such as viruses, various chemicals, radiation, chromosome abnormalities and spontaneous mutations. In recent years, research has guided to the development of chemo-protective factors, which derived from everyday diet food. Infusions from the plant *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* are rich in polyphenols.

The purpose of this research was to study the effect of 2 infusions (water and methanol) and 6 pure polyphenolic molecules (Kaempferol - 3 - o - rhamnoside, Quercetin - 3 - o - rhamnoside, Kaempferol - 3 - o - rutinoside, Quercetin - 3 - o - rutinoside, Caffeic acid and Apigenin - 6 - c - a - L - arabinopyranose - 8 - c - b - D - glucopyranose) of *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* at proliferation and apoptosis of human liver cancer cells (HepG2). To study the effect of infusions on HepG2 cell growth, XTT method was used, while the identification of apoptosis induction made by the method Cell Death Detection ELISA. The enzymatic activity of caspases 3, 8 and 9 at HepG2 cells is studied, too. Both infusions of *Lathyrus laxiflorus* presented growth inhibition of tumor liver cells (HepG2), but the water infusion gave the best results, especially in concentration 1600 mg / mL. Also, at all the molecules was observed decreament of cell growth in their biggest concentration, except of Kaempferol - 3 - O - rutinoside, which did not significantly reduce at any concentration. Moreover, apoptosis was observed by both infusions. The water one had a stronger effect, causing at the concentration of 1600 mg / mL apoptosis increment of 250% toward to the methanol one that caused increment of 200%. In this way, is demonstrated that inhibition of cell growth by infusions of *Lathyrus laxiflorus* due to apoptosis, which is considered as an important chemo-protective mechanism against cancer. Finally, the methanol infusion had little or almost zero effect on the enzymatic activity of caspases 3, 8 and 9 at HepG2 cells. The observed effects of *Lathyrus laxiflorus* at liver cancer cells HepG2, make it an interesting chemo-protective factor.

## Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>10</b>
<b>1.1. ΨΥΧΑΝΘΗ</b>	<b>10</b>
1.1.1. Γενικά	10
1.1.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις στα ψυχανθή	11
<b>1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>	<b>11</b>
1.2.1. Χημική δομή των πολυφαινολών	11
1.2.2. Φλαβονοειδή	13
1.2.3. Μη Φλαβονοειδή	16
1.2.4. Βιοσύνθεση των πολυφαινολών	17
1.2.5. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών	20
<b>1.3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ</b>	<b>22</b>
1.3.1. Γενικά	22
1.3.2. Βασικές λειτουργίες της απόπτωσης	24
1.3.3. Τα μονοπάτια της απόπτωσης και ρύθμισή της	27
1.3.4. Κασπάσες	31
1.3.4.1. Δομή και μηχανισμός κασπασών	32
1.3.4.2. Κασπάση 3	34
1.3.4.3. Κασπάση 8	35
1.3.4.4. Κασπάση 9	37
<b>1.4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	<b>37</b>
1.4.1. Κύρια στάδια της καρκινογένεσης	37
1.4.2. Καρκίνος και απόπτωση	38
1.4.3. Καρκίνος του ήπατος	40
<b>1.5. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ</b>	<b>40</b>
1.5.1. Γενικά	40
1.5.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	41
1.5.3. Φυσικοί και διατροφικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	43
<b>1.6. ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Lathyrus</i></b>	<b>44</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>48</b>
<b>2.1. ΥΛΙΚΑ</b>	<b>48</b>
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	48
2.1.2. Θρεπτικά υλικά	48



2.1.3. Εκχυλίσματα και πολυφαινολικά καθαρά μόρια	48
2.1.4. Διαδικασία εκχύλισης	50
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2	51
2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα HepG2 με τη μέθοδο XTT	51
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	51
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	51
2.2.3. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο ELISA Cell Death Detection.	53
2.2.3.1 Αρχή μεθόδου	53
2.2.3.2. Πειραματική διαδικασία	53
2.3.4. Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9	55
2.3.4.1. Αρχή της μεθόδου	55
2.3.4.2. Πειραματική διαδικασία	55
2.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ XTT	57
3.1.1. Εκχυλίσματα <i>Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus</i>	57
3.1.2. Πολυφαινολικά καθαρά μόρια του <i>Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus</i>	57
3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ Cell Death Detection ELISA	62
3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ Bradford ΚΑΙ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ 3, 8 ΚΑΙ 9 ΣΕ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	63
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΨΥΧΑΝΘΗ

### 1.1.1. Γενικά

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια φυτών *Leguminosae/Fabaceae*, που αποτελεί ομάδα δικοτυλήδων φυτών και περιλαμβάνει περίπου 700 γένη και περισσότερα από 18000 είδη. (Σπανού X., 2010). Η οικογένεια φυτών *Leguminosae* ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών και ταξινομείται σε τρεις υποοικογένειες: τη *Mimosoideae*, τη *Caesalpinioideae* και τη *Faboideae*. Τα ψυχανθή είναι συνήθως μονοετή φυτά, ωστόσο η ζωή τους μπορεί να κρατήσει μέχρι και τρία χρόνια.

Φύονται σε όλα σχεδόν τα μέρη του κόσμου και αποτελούν πολύ σημαντικά φυτά με μεγάλο οικονομικό και διατροφικό ενδιαφέρον. Στα ψυχανθή κατατάσσονται τα καρποδοτικά φυτά, τα οποία καλλιεργούνται για την παραγωγή σπόρων ή καρπών που προορίζονται για κατανάλωση από τους ανθρώπους (όσπρια) και για ζωοτροφή. Ως όσπρια χαρακτηρίζονται οι καρποί και τα σπέρματα διάφορων ψυχανθών, τα οποία καταναλώνονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Εκτός από τους ξηρούς σπόρους σημαντικές ποσότητες ψυχανθών καταναλώνονται από τον άνθρωπο υπό τη μορφή χλωρών λοβών ή σπερμάτων. Τα κυριότερα εδώδιμα ψυχανθή είναι τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris* L.), τα ρεβίθια (*Cicer arietinum* L.), οι φακές (*Lens culinaris*), τα κουκιά (*Vicia faba*), τα λουπίνια (*Lupinus spp.*), το λαθούρι (φάβα) (*Lathyrus sativus*), τα μπιζέλια (*Pisum sativum* L.) και η σόγια (*Glycine max*) (Σπανού X., 2010)

Επιπλέον, στα ψυχανθή ανήκουν και χορτοδοτικά φυτά, τα οποία καλλιεργούνται ως κτηνοτροφικά για παραγωγή ξηρού χόρτου και σπόρου για την κτηνοτροφία. Τα σπουδαιότερα που καλλιεργούνται κυρίως για παραγωγή ξηρού χόρτου είναι η μηδική, ο βίκος και το τριφύλλι, ενώ τα σημαντικότερα που καλλιεργούνται για το σπόρο τους και εν συνεχεία χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, είναι τα μπιζέλια, τα κτηνοτροφικά κουκιά, τα λούπινα και η σόγια.

Επίσης τα ψυχανθή καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά, για τα ελαιούχα σπέρματά τους και κυρίως για την ικανότητά τους να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (Σπανού X., 2010)

### **1.1.2. Βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις στα ψυχανθή**

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης, οι οποίες έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων και έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ., 2010).

Η κατανάλωση ψυχανθών συσχετίζεται με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις. Όμως ο αριθμός των πληροφοριών, οι οποίες αφορούν στην περιεκτικότητα των ψυχανθών σε βιοδραστικές – φυτοχημικές ενώσεις, με εξαίρεση τη σόγια, είναι μικρός, παρά τη σημαντική τους διατροφική αξία (Crozier et al., 2009). Η κατανάλωση φυτοχημικών ουσιών ως τμήμα της διατροφής του ανθρώπου μπορεί να αποτρέψει διάφορες ασθένειες όπως τις καρδιακές παθήσεις και τον καρκίνο (Dekker, 2004).

Οι σημαντικότερες φυτοχημικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί στα ψυχανθή είναι οι πολυφαινόλες, οι οποίες ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα μη φλαβονοειδή χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις λιγνάνες (Crozier et al., 2006). Ιδιαίτερα οι διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τις ποικίλες βιολογικές τους ιδιότητες, καθώς αποτελούν τις κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των φυτών. Στις πολυφαινόλες έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες.

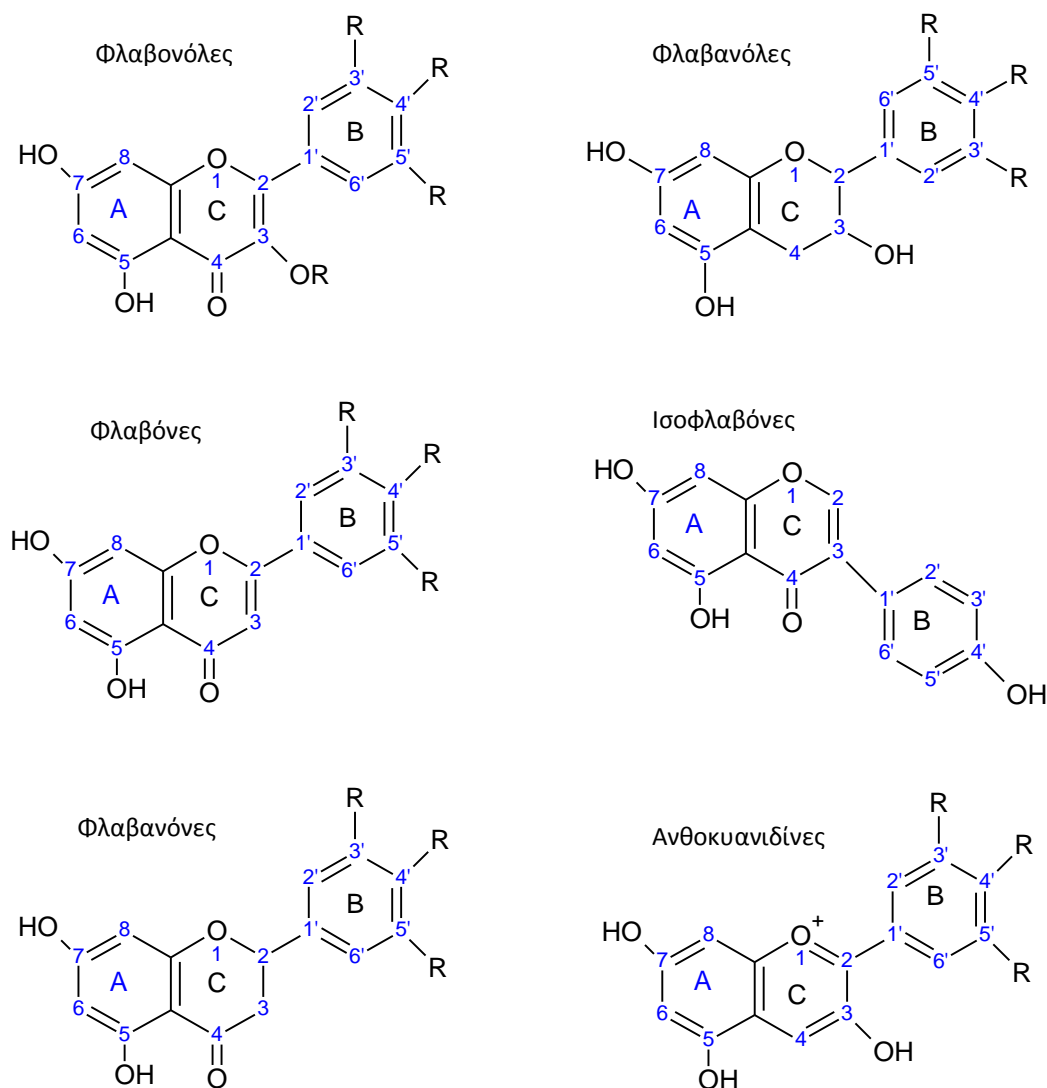
## **1.2. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ**

### **1.2.1. Χημική δομή των πολυφαινολών**

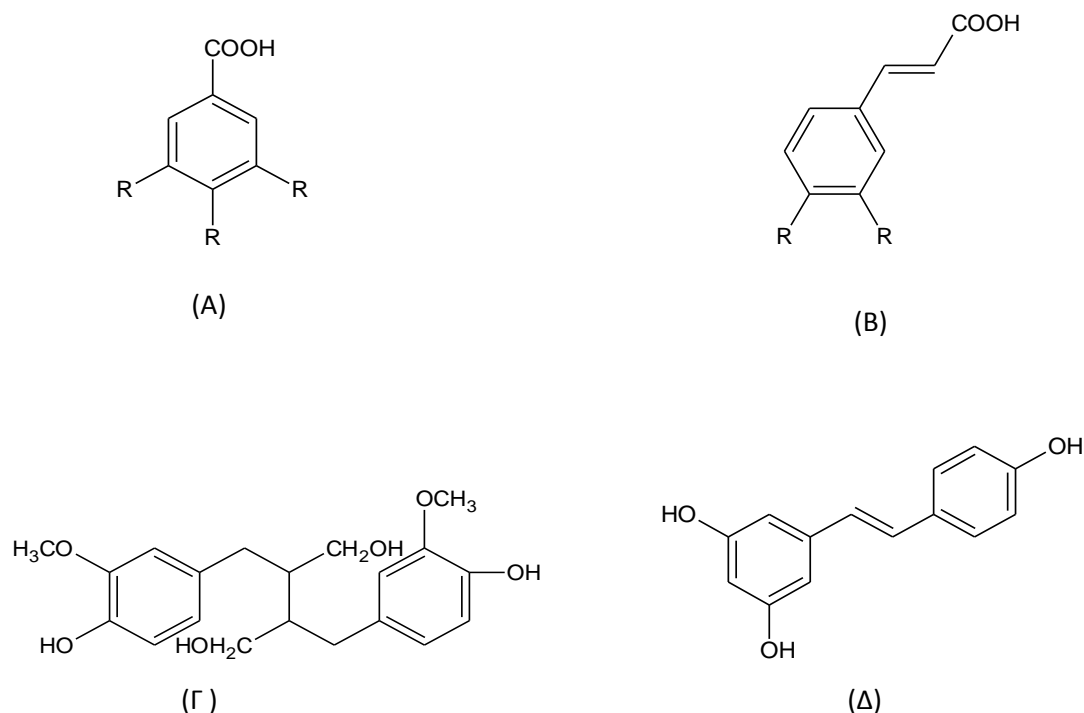
Τα κυριότερα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών είναι οι πολυφαινόλες. Είναι υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών και σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006).

Μια πολυφαινολική ένωση αποτελείται από τουλάχιστον έναν αρωματικό (βενζοϊκό) δακτύλιο και μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες συνδεδεμένες με τους άνθρακες των δακτυλίων. Στη φύση απαντώνται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή, με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη και άλλα σάκχαρα. Ως προς τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Με βάση τη χημική τους δομή ταξινομούνται σε

κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν, καθώς και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτύλιους μεταξύ τους. Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο βασικές κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα, στιλβένια και λιγνάνες).



**Σχήμα 1:** Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006).



**Σχήμα 2:** Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στυλβενίων και λιγνάνων. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκιναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ) Σεκοϊσολاريσινολή (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στυλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006).

### 1.2.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο σημαντική και καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 5000 ενώσεις σε πολλές φυτικές πηγές. Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Δρουν αντιοξειδωτικά προστατεύοντας από διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Kenneth et al., 1999).

Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μια διάταξη με δύο αρωματικούς δακτύλιους που συνδέονται με έναν ανθρακικό πυρανικό δακτύλιο (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών μπορεί να έχει πολυάριθμους υποκαταστάτες (Σχήμα 1.3). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρικήτίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανίδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεονίνης και της

απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (κυανιδίνη) (Manach et al., 2004) (Εικόνα 1).

#### *Φλαβονόλες*

Οι φλαβονόλες αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα τρόφιμα. Οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη, η καμπφερόλη και η μυρικετίνη. Συνήθως βρίσκονται σε γλυκοσυλιωμένη μορφή ως O – γλυκοσίδια και συσσωρεύονται κυρίως στην επιδερμίδα και στα φύλλα του φυτού εφόσον η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως (Manach et al., 2004).

#### *Φλαβανόλες*

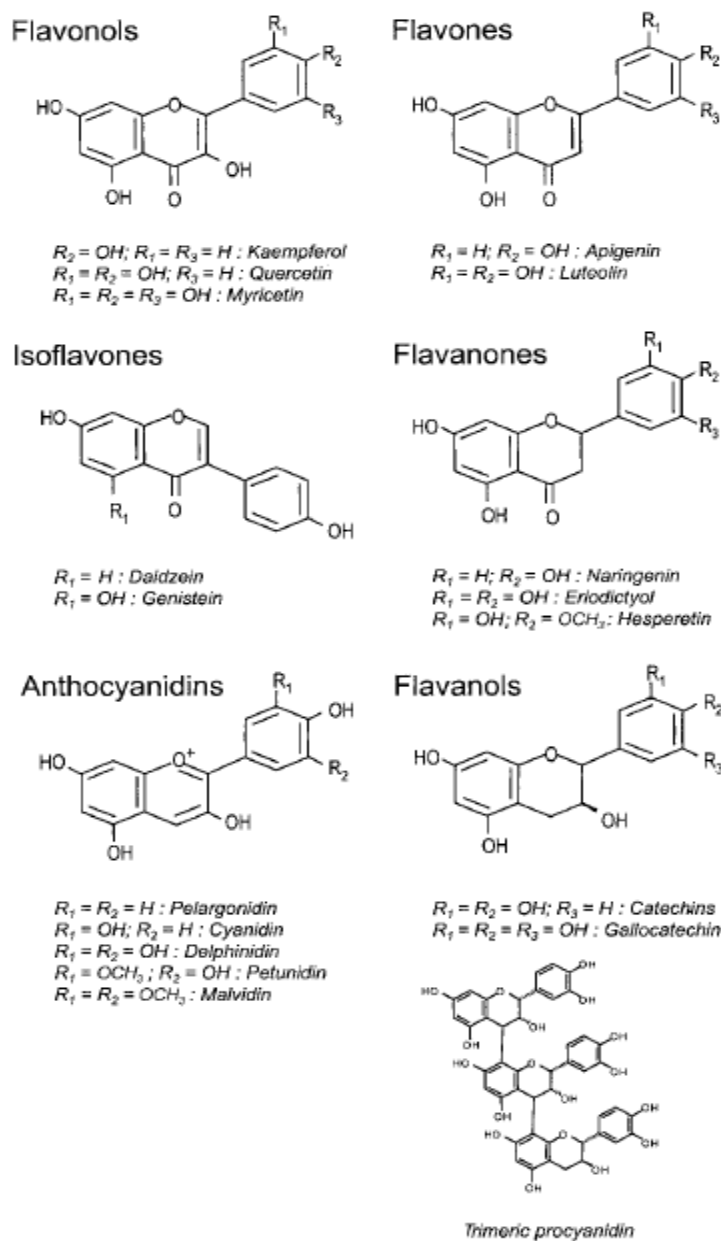
Οι φλαβανόλες αποτελούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών και υπάρχουν είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες) (Crozier et al., 2006). Οι προανθοκυανιδίνες ονομάζονται και συμπτυκνωμένες ταννίνες και κατεργαζόμενες με ισχυρά οξέα υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

#### *Φλαβόνες*

Οι κυριότερες φλαβόνες που εντοπίζονται στα φρούτα και στα λαχανικά είναι γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης. Οι περισσότερες υπάρχουν ως 7 - O – γλυκοσίδια.

#### *Φλαβανόνες*

Οι κυριότερες φλαβανόνες είναι η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριοντικτιόλη. Η χημική δομή τους επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες (Manach et al., 2004).



**Εικόνα 1:** Χημική δομή των φλαβονοειδών (από Manach et al., 2004).

### Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα γιατί παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα, έχοντας την ικανότητα να δεσμεύονται στους υποδοχείς των οιστρογόνων. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και κυρίως στη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντετζεΐνης και γενιστεΐνης (Manach et al., 2004).

### *Ανθοκυανιδίνες*

Οι ανθοκυανιδίνες εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και των φρούτων και προσδίδουν ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Μέσα στο φυτό είναι πολύ ανθεκτικές στο φως, το pH και σε καταστάσεις οξείδωσης. Η κυανιδίνη είναι η κύρια εκπρόσωπός τους (Manach et al., 2004).

### **1.2.3. Μη Φλαβονοειδή**

#### *Φαινολικά οξέα*

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα υδροβενζοϊκά (C6-C1) και στα υδροξυκινναμικά (C6-C3). Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό, το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ, ενώ από τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004). Η δράση του καφεϊκού οξέος τόσο στην απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων όσο και στη δραστηριότητα της κασπάσης 3 είναι γνωστή από πολλές μελέτες (Lee et al., 2005).

#### *Στιλβένια*

Τα στιλβένια ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που ονομάζονται φυτοαλεξίνες, οι οποίες είναι ουσίες που παράγονται στα φυτά κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικού στρες. Από τα πιο μελετημένα και πιο χαρακτηριστικά στιλβένια που βρίσκονται κυρίως στα σταφύλια είναι η trans – ρεσβερατρόλη (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

#### *Λιγνάνες*

Οι λιγνάνες είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα. Οι κύριες φυτικές λιγνάνες είναι η σεκοϊσο καΐλαρισισρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη, οι οποίες μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα στις λιγνάνες των θηλαστικών εντεροδιόλη και εντερολακτόνη αντίστοιχα. Υπάρχουν στα ψυχανθή, στα φρούτα, στα δημητριακά, στο λιναρόσπορο και στα λαχανικά (Manach et al., 2004).

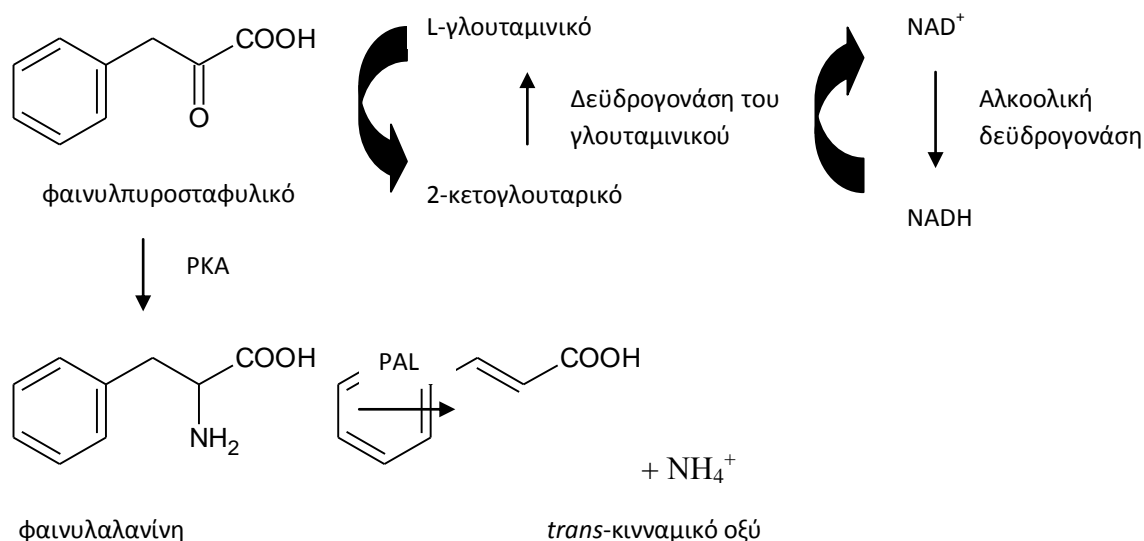


#### 1.2.4. Βιοσύνθεση των πολυφαινόλων

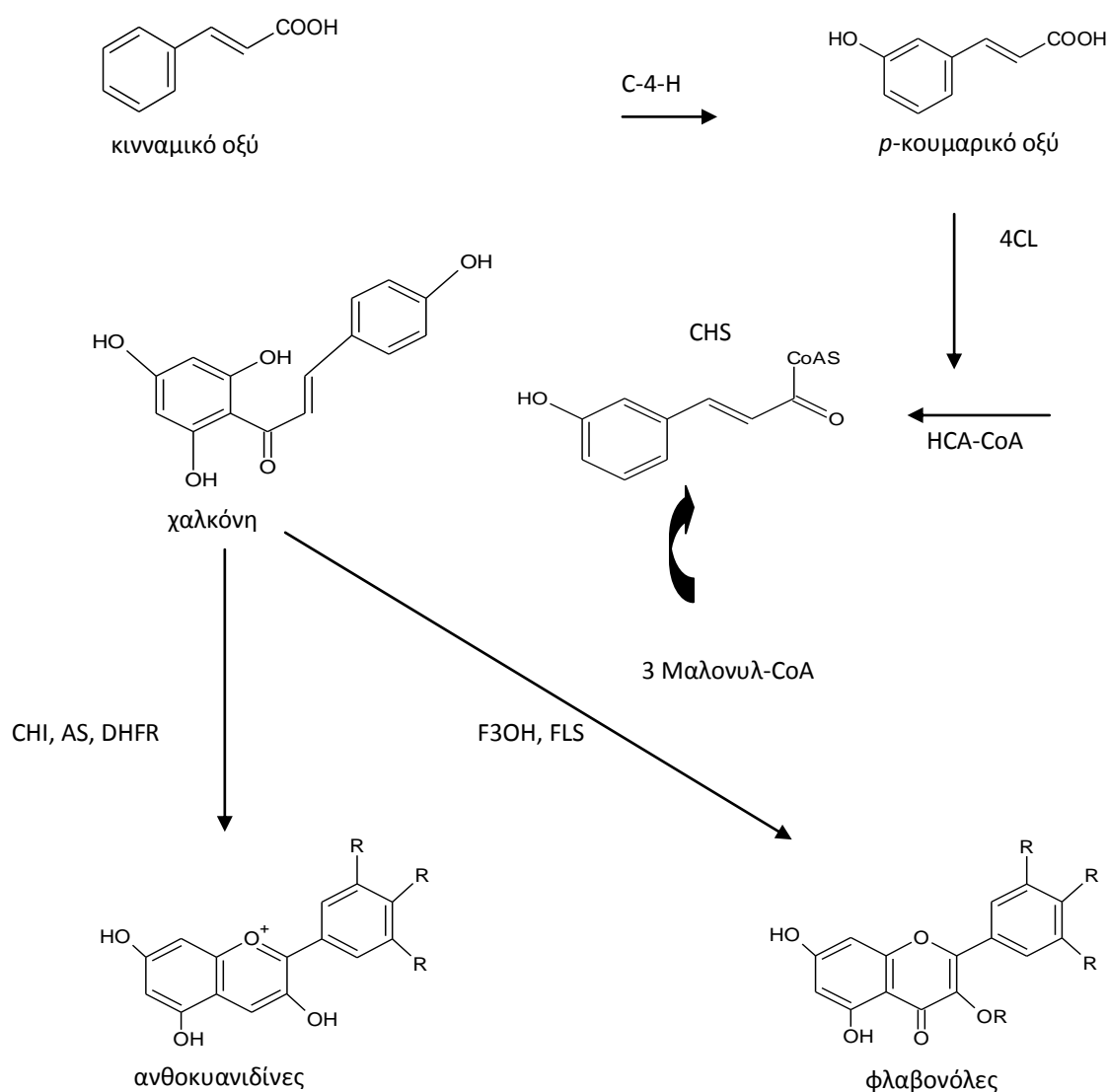
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων, οι οποίες βιοσυντίθενται με αρκετά διαφορετικές πορείες. Η βιοσύνθεση των πολυφαινόλων γίνεται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού και του μαλονικού οξέος (Crozier et al., 2006). Το μονοπάτι του σικιμικού οξέος συμμετέχει στη βιοσύνθεση των περισσότερων πολυφαινολικών ενώσεων, καθώς προμηθεύει τον αρωματικό δακτύλιο για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης από τα οποία προκύπτουν οι πολυφαινόλες. Τα υδροξυκιναμικά οξέα (C6-C3) και τα φλαβονοειδή (C6-C3-C6) παράγονται από την φαινυλαλανίνη (Σπανού Χ., 2010).

Το πρώτο στάδιο στη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών περιλαμβάνει το σχηματισμό φαινυλαλανίνης από το φαινυλοπυροσταφυλικό και η οποία τελικά μετατρέπεται σε κιναμικό οξύ μέσω του σικιμικού μονοπατιού (Σχήμα 3). Στη συνέχεια από το κιναμικό οξύ παράγονται τα πολυφαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή μέσω του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλπροπανοειδή και του ειδικού μονοπατιού για τα φλαβονοειδή αντίστοιχα (Σχήμα 4).

Η *trans*-ρεσβερατρόλη παράγεται από τη συμπύκνωση του *p*-κουμαρυλ-CoA (το οποίο είναι προϊόν του γενικού μονοπατιού για τα φαινυλπροπανοειδή) με τρία μόρια μάλονυλ-CoA που καταλύεται από τη συνθετάση της ρεσβερατρόλης.



**Σχήμα 3:** Βιοχημικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Το φαινυλπροσταφυλικό μετατρέπεται από την L-φαινυλαλανίνη-2-κετογλουταρική αμινοτρανσφεράση (PKA) παρουσία του L-γλουταμινικού σε φαινυλαλανίνη. Στη συνέχεια μέσω της λύσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας (PAL) η φαινυλαλανίνη μετατρέπεται σε *trans*-κινναμικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση αμμωνιακών ιόντων (Στάγκος Δ., 2006).



**Σχήμα 4:** Βιοσύνθεση των πολυφαινολών. Το κινναμικό οξύ υδρολύεται από την υδροξυλάση του 4-κινναμικού (C-4-H) σε *p*-κουμαρικό οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε *p*-κουμαρυλ-CoA (HCA-CoA) από την 4-CoA λιγάση (4CL), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των πολυφαινολικών οξέων (γενικό μονοπάτι για τα φαινυλπροπανοειδή). Το HCA-CoA παρουσία της συνθετάσης της χαλκόνης (CHS) συμπυκνώνεται με 3 μόρια μαλόνυλ-CoA και σχηματίζει τη χαλκόνη, η οποία μετατρέπεται σε διάφορα φλαβονοειδή όπως φλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες (ειδικό μονοπάτι για τα φλαβονοειδή). CHI: ισομεράση της χαλκόνης, F3OH: υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης, AS: συνθετάση της ανθοκυανίνης, DHFR: ρεδοκτάση της δυϊδροφλαβονόλης, FLS: συνθετάση της φλαβονόλης (Στάγκος Δ., 2006).

### 1.2.5. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών

Παρά την ευρεία κατανομή τους, οι επιδράσεις των διατροφικών πολυφαινολών στην υγεία έχουν τραβήξει την προσοχή των διατροφολόγων μόνο τα τελευταία χρόνια. Οι πολυφαινόλες είναι τα πιο άφθονα αντιοξειδωτικά στη διατροφή του ανθρώπου και είναι ευρέως διαδεδομένα συστατικά των φρούτων, των λαχανικών, των δημητριακών, του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, των όσπριων, της σοκολάτας και των ροφημάτων, όπως το τσάι, του καφέ και του κρασιού (Manach et al., 2004). Ένας από τους κύριους παράγοντες, ο οποίος ευθύνεται για την καθυστέρηση της έρευνας σε σχέση με τις πολυφαινόλες, είναι η ποικιλία και η πολυπλοκότητα της χημικής τους δομής, η οποία επηρεάζει την αντιοξειδωτική δύναμη. Ως αντιοξειδωτικά οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου 2 και ο καρκίνος (Benzie et al., 1996; Rice-Evans et al., 1995; Scalbert A. et al., 2005). Ωστόσο, στοιχεία από μια σειρά μελετών υποδηλώνουν ότι σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αρκετές πρόσθετες ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να είναι ανεξάρτητες των παραδοσιακών αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων (Casalini et al., 1999; Giovannelli et al., 2000; Tagasi et al., 1995). Αυτό επισημαίνεται επίσης από δύο τουλάχιστον λόγους. Πρώτον, οι φαινολικές ενώσεις μεταβολίζονται *in vivo*, δημιουργώντας ενώσεις, οι οποίες χάνουν το αρχικό αντιοξειδωτικό δυναμικό (Huber et al., 1997; Lodovici et al., 2000). Δεύτερον, οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα ή στους ιστούς είναι χαμηλότερες από αυτές των άλλων αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη, τα οποία καθιστούν τον ανταγωνισμό τους απίθανο (Boyle et al., 2000; Lampe J. W., 1999; Lean et al., 1999; Leighton et al., 1999). Τέτοιοι καινοφανείς μηχανισμοί της δράσης των διατροφικών πολυφαινολών ενδέχεται να επιφέρουν την αλληλεπίδρασή τους με τα μοριακά μονοπάτια μεταγωγής σήματος των κυττάρων, επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων και κατά συνέπεια διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Masella et al., 2005).

Επίσης, οι διατροφικές πολυφαινόλες έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας τους να ενεργούν ως ιδιαίτερα αποτελεσματικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έναντι της καρκινογένεσης (Bode A. M. & Dong Z., 2004; Kandaswami et al., 2005; Thomasset et al., 2007). Επιπλέον, η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες ανεπιθύμητες παρενέργειες, οι οποίες συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών, αποτελούν πρόσθετα

πλεονεκτημάτά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M. & Dong Z., 2006).

Αρκετοί μηχανισμοί μπορούν, τουλάχιστον εν μέρει, να εξηγήσουν την αποτελεσματικότητα αυτών των ενώσεων ως χημειοπροστατευτικών παραγόντων σε καρκινικά κύτταρα. Έτσι έχει αποδειχτεί ότι οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να: 1. Καταστέλλουν την υπερ-έκφραση των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου. Στην πραγματικότητα, ρυθμίζοντας το οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα, οι πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν το σήμα της μεταγωγής, την ενεργοποίηση οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων παραγόντων μεταγραφής και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση (Rahman et al., 2006; Sang et al., 2005). 2. Επηρεάζουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας έτσι τα γονίδια – στόχους που συμμετέχουν στην επιβίωση των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό. 3. Αναστέλλουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) εξουδετερώνοντας την αγγειογένεση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων. 4. Επιπλέον, ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων υποδεικνύει ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να διαμορφώσουν άμεσα διάφορα σημεία της διαδικασίας της απόπτωσης και/ή την έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης – 9, της κασπάσης – 3 (Ong et al., 2004; Shimizu et al., 2005; Selvendiran et al., 2006; Michels et al., 2005) και της κασπάσης – 8 (Selvendiran et al., 2006), η μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl – 2 και Bcl – XL, η επαγωγή της έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak (Selvendiran et al., 2006; Kuo & Lin, 2003; Lee et al., 2005) και η τροποποίηση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF – κB (Gong et al., 2003; Thomasset et al., 2007; Aggarwal B. B. & Shishodia S., 2006; Na H. K. & Surh Y. J., 2006; Prescott S. M. & Fitzpatrick F. A., 2000; Subbaramaiah et al., 2003; Turini M. E. & DuBois R. N., 2002; Oak et al., 2005; Shankar S. & Singh G. & Srivastava R. K., 2007; Shankar S. & Ganapathy S. & Srivastava R. K., 2007).

### **1.3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

#### **1.3.1. Γενικά**

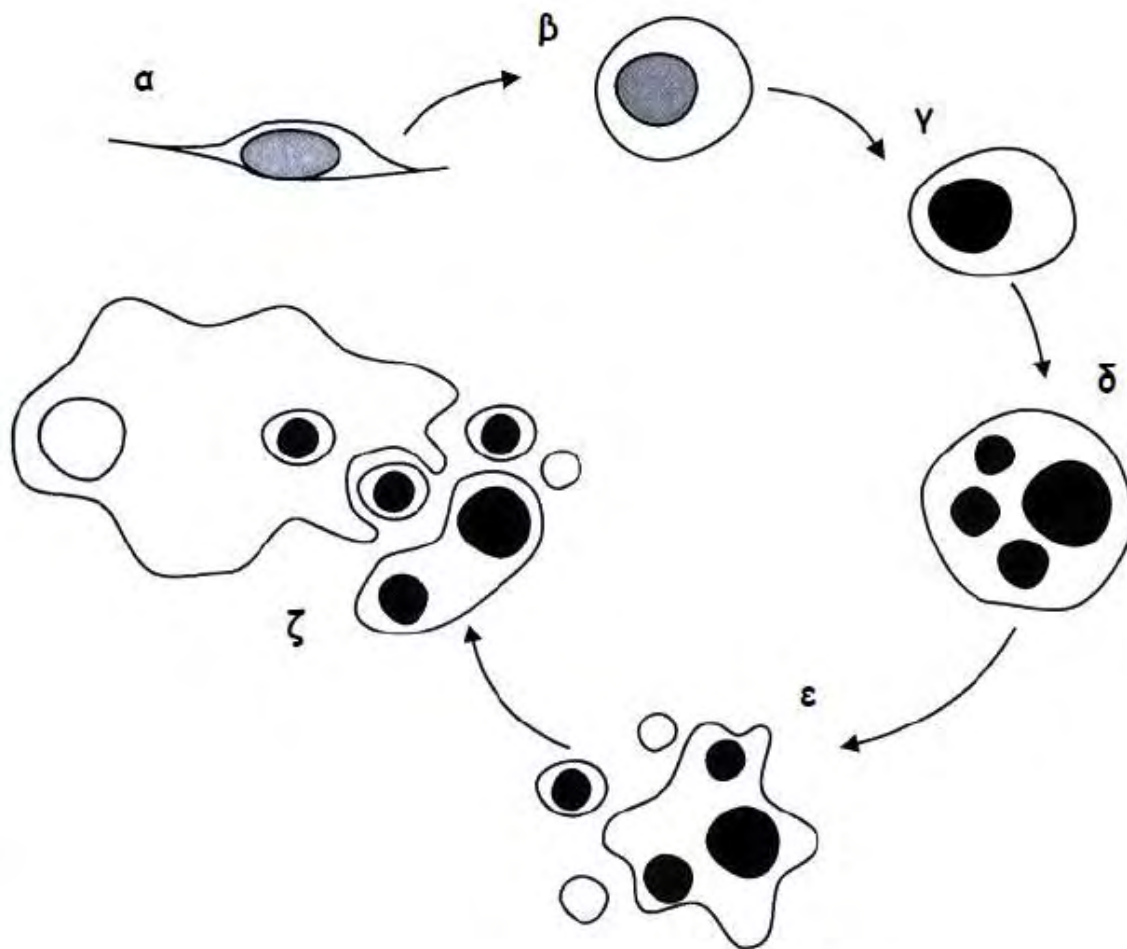
Ο κυτταρικός θάνατος διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τους μηχανισμούς που ευθύνονται για την απώλεια βιωσιμότητας: τη νέκρωση και την απόπτωση. Η νέκρωση είναι μια τυχαία ή παθολογική παθητική διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την

προοδευτική διάλυση των κυτταρικών δομών. Συμβαίνει μετά από μη αναστρέψιμη βλάβη που οφείλεται σε περιβαλλοντικές αλλαγές, όπως η απότομη και σοβαρή ισχαιμία, οι ακραίες θερμοκρασίες και τα μηχανικά τραύματα (Μπαμπας Ε., 2009).

Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής ‘αυτοκτονίας’ απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Είναι μια φυσική διαδικασία με την οποία το κύτταρο οδηγείται στον προγραμματισμένο θάνατο. Η διαδικασία της απόπτωσης συνοδεύεται από χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου (Εικόνα 2). Συρρίκνωση του κυττάρου, εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη, συμπύκνωση της χρωματίνης, αποδιάταξη του DNA, διάσπαση του κυτταρικού πυρήνα και αποσυναρμολόγησή του μέσα σε αποπτωτικά κυστίδια, εγκόλπωση των αποπτικών κυστιδίων από μακροφάγα είναι χαρακτηριστικά τα οποία διακρίνουν την απόπτωση από την νέκρωση (Song & Steller, 1999; Krueger et al., 2001).

Η απόπτωση εμπλέκεται σε διάφορες καταστάσεις όπως η φυσιολογική ανανέωση κυττάρων, η μορφογένεση των εμβρυικών ιστών, η ανοσολογική ρύθμιση (εξάλειψη των αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκυττάρων του θύμου αδένος κατά την ανάπτυξη), η μειωμένη σύνθεση ορμονών, η μειωμένη πρόσληψη τροφικών παραγόντων, η πρόκληση κυτταρικών βλαβών από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (όπως η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, τοξική κυτταρική βλάβη, ιογενείς λοιμώξεις) και τα κακοήγη νεοπλάσματα (Μπάμπας Ε., 2009; Vermeulen et al., 2005; Fadeel & Orrenius, 2005). Επίσης, μετά την αποκόλληση των κυττάρων από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, όπως συχνά συμβαίνει στα επιθήλια, πραγματοποιείται η εξάλειψή τους μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ο ιδιαίτερος αυτός τύπος της απόπτωσης είναι γνωστός με τον όρο «apoptosis» (Κουλούκουσα και συν., 2003). Τα παραπάνω απεικονίζονται συνοπτικά στην εικόνα 3.

Την τελευταία δεκαετία η βασική έρευνα για τον καρκίνο έχει να επιδείξει αξιοσημείωτες προόδους στην κατανόηση της βιολογίας και της γενετικής του καρκίνου. Ένα από τα πιο σπουδαία επιτεύγματα είναι η συνειδητοποίηση πως η απόπτωση και τα γονίδια που την ελέγχουν, έχουν σημαντική επίδραση στον κακοήγη φαινότυπο. Η κατανόηση της απόπτωσης έχει εξασφαλίσει τη βάση για νέες στοχευμένες θεραπείες που επάγουν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή τα καθιστούν ευαίσθητα στους καθερωμένους κυτταροτοξικούς παράγοντες και την ακτινοθεραπεία. (Μπάμπας Ε., 2009).



**Εικόνα 2:** Σχηματική αναπαράσταση των μορφολογικών αλλαγών στο κύτταρο κατά την διάρκεια της απόπτωσης. Όταν ένα κύτταρο προσκόλλησης δεχτεί ένα αποπτωτικό σήμα (α) αρχίζει να γίνεται κυκλικό (β) και το πυρηνικό DNA να συμπυκνώνεται (γ). Το DNA κατακερματίζεται και ο πυρήνας αρχίζει να σπάει σε ξεχωριστά σώματα χρωματίνης (δ). Τελικά, το κύτταρο διαλύεται σε αρκετά κυστίδια (αποπτωτικά σώματα) (ε), τα οποία φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα.



**Εικόνα 3:** Καταστάσεις που σχετίζονται με την απόπτωση.

Τα γονίδια που ελέγχουν την απόπτωση, έχουν προσδιοριστεί στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Ονομάζονται γονίδια ced (cell death, γονίδια κυτταρικού θανάτου). Τα γονίδια ced 3 και ced 4 προάγουν τον κυτταρικό θάνατο, ενώ το γονίδιο ced 9 τον αποτρέπει. Η ρύθμιση της απόπτωσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και πλήθος γονιδίων συμμετέχουν σε αυτή. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε εκείνα που προάγουν την απόπτωση (όπως p53, c-myc, E2F, Fas, Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs) και σε εκείνα που την αναστέλλουν (όπως Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1, A-I, crmA, p35) (Νακοπούλου και Μιχαλοπούλου, 1997).

### 1.3.2. Βασικές λειτουργίες της απόπτωσης

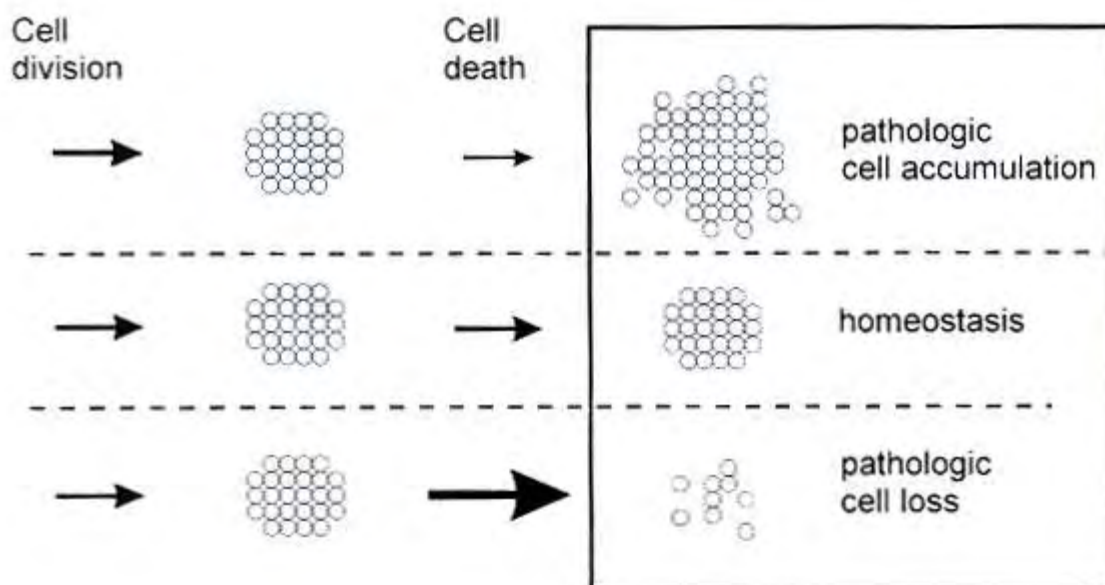
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απόπτωση βασίζεται σε ένα γενετικό πρόγραμμα που είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης και λειτουργίας του οργανισμού. Έχει σαν σκοπό



να εξαλείψει ανεπιθύμητα ή περιττά κύτταρα με στοχευμένο τρόπο. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες ενεργοποιείται το αποπτωτικό πρόγραμμα, ποικίλουν (Krauss G., 2002).

#### ***A) Ομοιόσταση των ιστών***

Στην απόπτωση αποδίδεται κεντρική σημασία στην ομοιόσταση των ιστών, το γεγονός δηλαδή ότι σε ένα όργανο ή ιστό, ο αριθμός των κυττάρων πρέπει να διατηρείται σταθερός μέσα σε στενά όρια. Μια αύξηση στον αριθμό των κυττάρων οφειλόμενη σε κυτταρική διαίρεση αντισταθμίζεται από διαδικασίες για την εξάλειψη των κυττάρων που δεν είναι πλέον λειτουργικά ή είναι γερασμένα. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία που βοηθά να διατηρηθεί ο αριθμός των κυττάρων σε έναν ιστό μέσα σε όρια τα οποία είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη και τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Αν συμβεί κάποιο ελάττωμα στο αποπτωτικό πρόγραμμα, η συνέπεια μπορεί να είναι μια παθολογική αύξηση ή μείωση των κυττάρων (Εικόνα 3). Παραδείγματα ασθενειών που σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό κυτταρικής επιβίωσης είναι ο καρκίνος και τα αυτοάνοσα νοσήματα. Ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση περιλαμβάνουν το AIDS και νευροεκφυλιστικά νοσήματα.



**Εικόνα 4:** Επίδραση της απόπτωσης στην ομοιόσταση μιας ομάδας κυττάρων. Σε έναν αναπτυσσόμενο οργανισμό, ο κυτταρικός αριθμός σε έναν ιστό καθορίζεται από τη σχέση μεταξύ του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης και κυτταρικού θανάτου. Οι ρυθμοί και των δυο διαδικασιών αναπαρίστανται στην εικόνα από το μέγεθος των βελών. Σε έναν φυσιολογικό ιστό, ο κυτταρικός αριθμός παραμένει σταθερός (ομοιόσταση) εφόσον και οι δυο διαδικασίες γίνονται με τον ίδιο ρυθμό. Αν ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπερिशύει, ασθένειες που λαμβάνουν χώρα χαρακτηρίζονται από αύξηση του κυτταρικού αριθμού (π.χ. στον καρκίνο). Στην αντίθετη περίπτωση, όταν ο ρυθμός κυτταρικού θανάτου υπερिशύει, ο κυτταρικός αριθμός μειώνεται με παθολογικό τρόπο. Απουσία αντισταθμιστικών αλλαγών στο ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης, αλλαγές στη διάρκεια της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσουν είτε σε συσσώρευση των κυττάρων ή σε απώλεια κυττάρων.

### ***B) Ανάπτυξη και διαφοροποίηση***

Η απόπτωση έχει ένα αναπόσπαστο ρόλο στις διαδικασίες ανάπτυξης και διαφοροποίησης, ειδικά στο έμβρυο. Στην περίπτωση αυτή εξασφαλίζει έναν τρόπο «διακόπτη» της λειτουργίας των κυττάρων που δεν χρειάζονται πια κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής μορφογένεσης.

### ***Γ) Ανοσοποιητικό σύστημα***

Στο ανοσοποιητικό σύστημα, τα αποπτωτικά προγράμματα ενεργοποιούνται σε διάφορες καταστάσεις. Στα παραδείγματα περιλαμβάνονται:

Εξάλειψη στοχευμένων κυττάρων (π.χ. κύτταρα μολυσμένα από ιό) από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα.

Εξάλειψη των αυτοαντιδρώντων B- ή T-λεμφοκυττάρων, φυσική επιλογή και εξάλειψη των κυττάρων στο θύμο: 95% των T-κυττάρων που μεταναστεύουν στο θύμο εξαλείφονται με απόπτωση.

#### ***Δ) Κυτταρική βλάβη***

Μια άλλη λειτουργία της απόπτωσης είναι η καταστροφή των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Το αποπτωτικό πρόγραμμα μπορεί να ενεργοποιηθεί από την παρουσία βλάβης στα κύτταρα ή κατά τη διάρκεια στρες. Κύτταρα με DNA που έχει υποστεί βλάβη μπορούν να εξαλειφθούν με τη βοήθεια αποπτωτικών προγραμμάτων πριν να έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύσουν μεταλλάξεις και πιθανόν να εκφυλιστούν σε καρκινικά κύτταρα (Krauss G., 2002).

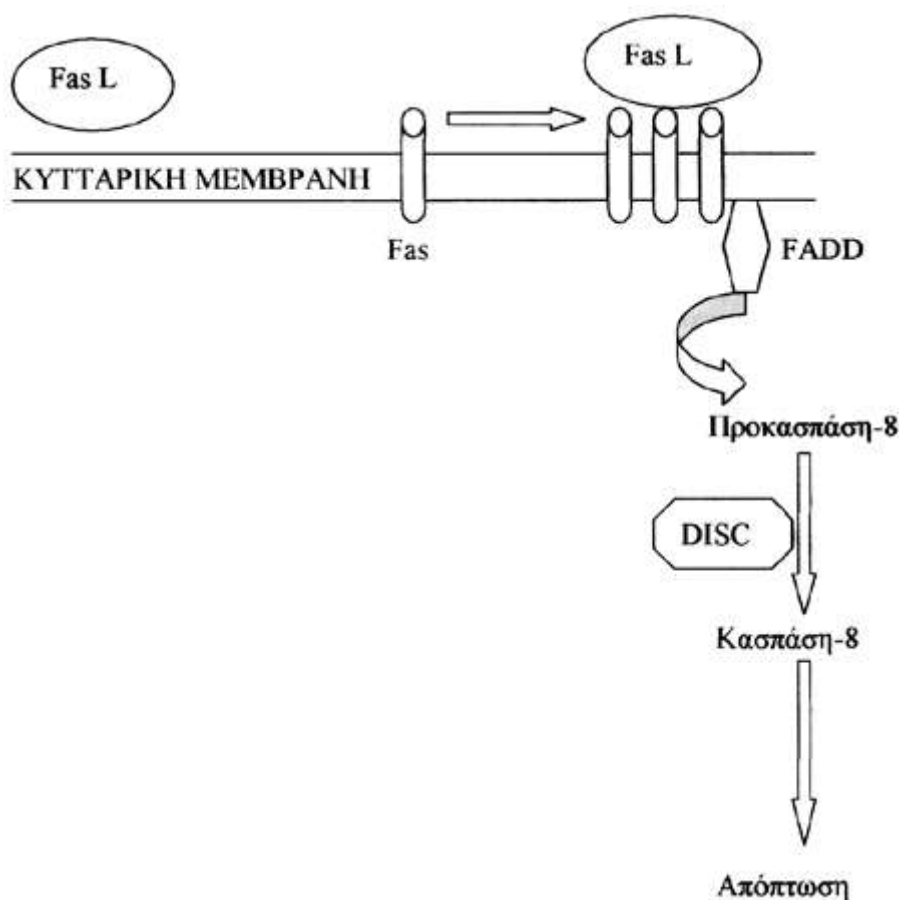
### **1.3.3. Τα μονοπάτια της απόπτωσης και ρύθμισή της**

Αναγνωρίζονται δύο βασικά μονοπάτια δια μέσου των οποίων το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο στα πλαίσια της απόπτωσης. Το πρώτο (εξωγενές ή κυτταροπλασματικό ή εξαρτώμενο από τους υποδοχείς θανάτου) ενεργοποιείται διαμέσου του υποδοχέα θανάτου Fas (CD 95) ,ο οποίος είναι μέλος της υπερ-οικογένειας υποδοχέων του TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων). Το εξωγενές μονοπάτι περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τους υποδοχείς θανάτου DR3, DR4, DR5, DR6, το σύμπλεγμα Fas και τις κασπάσες 8 και 10, που τελικά ενεργοποιούν τις υπόλοιπες κασπάσες οδηγώντας στην απόπτωση. Ο πιο αναλυτικός μελετημένος υποδοχέας θανάτου είναι ο Fas όπως αντίστοιχα και ο ρόλος του στην ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης (Krueger et al., 2001).

Συγκεκριμένα, όταν στον Fas συνδέεται το μόριο FasL (CD 95L), τρεις ή περισσότεροι υποδοχείς Fas πλησιάζουν δημιουργώντας μια θέση σύνδεσης για μια πρωτεΐνη που ονομάζεται FADD (Fas - associated death domain protein). Η πρωτεΐνη αυτή εν συνεχεία δεσμεύει την προκασπάση 8 και το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της τελευταίας δια μέσου ενός συστήματος πρωτεϊνών, το οποίο καλείται DISC (death – inducing signaling complex) (Krueger et al., 2001; Khan et al., 2007). Το μονοπάτι, που περιγράφηκε προηγουμένως, αναστέλλεται από μια ομάδα πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται FLIP (Fas - associated death domain - like interleukin - 1beta - converting enzyme – inhibitory protein)

και οι οποίες συνδέονται με την προκασπάση 8, αλλά αδυνατούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίησή της. Διάφοροι ιοί παράγουν τις πρωτεΐνες αυτές και μέσω αυτού του μηχανισμού τα κύτταρα, τα οποία προσβάλλονται από τους συγκεκριμένους ιούς, δεν υφίστανται απόπτωση (Krueger et al., 2001; Broker et al., 2005; Kataoka et al., 2000). Τα παραπάνω φαίνονται στην εικόνα 5 όπου απεικονίζεται η ενεργοποίηση μονοπατιού της απόπτωσης και ο ρόλος του Fas.

Η σηματοδότηση από τον Fas διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων στα οποία έχουν συμβεί μεταλλάξεις ή των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από κάποιο ιό και για αυτό το λόγο ελαττώματα σε αυτό το μονοπάτι εμπλέκονται σε πολλά κακοήγη και αυτοάνοσα νοσήματα.



**Εικόνα 5:** Ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης και ο ρόλος των Fas, FADD, DISC (Τροποποίηση από Robbins και Cotran 2003).

Το δεύτερο μονοπάτι (ενδογενές ή μιτοχονδριακό) ενεργοποιούμενο οδηγεί στην αποδέσμευση του κυτοχρώματος - c από τα μιτοχόνδρια. Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl - 2, κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Μέχρι σήμερα 15 μέλη της οικογένειας αυτής έχουν ταυτοποιηθεί στα κύτταρα των θηλαστικών. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει προ-αποπτωτικά μέλη (όπως Bax, Bak, Bad, Bxl - Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk) και αντι-αποπτωτικά μέλη (όπως Bcl - 2, Bcl - Xl, Bcl - W, Bfl - 1, Mcl - 1). Τα αντι-αποπτωτικά μέλη δρουν ως καταστολείς της απόπτωσης, αναστέλλοντας την αποδέσμευση του κυτοχρώματος - c από τα μιτοχόνδρια (Ghobrial et al., 2005; Vermeulen et al., 2005).

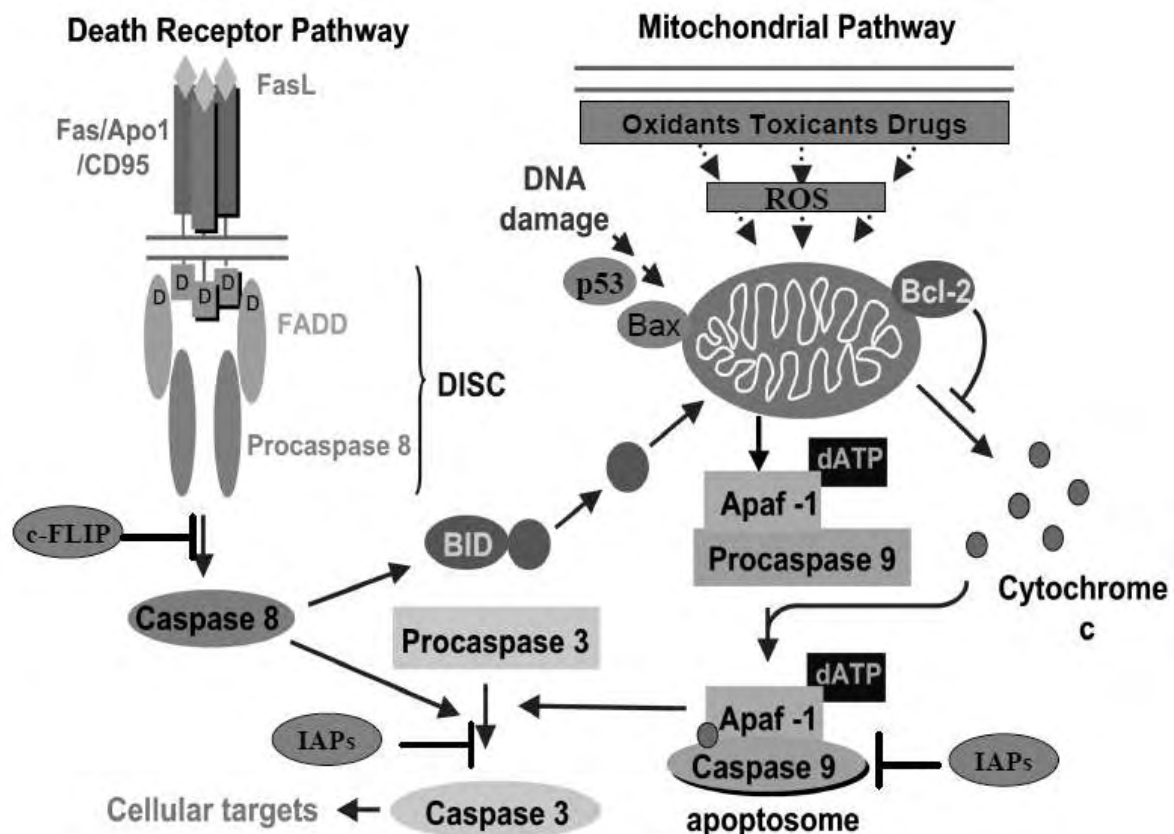
Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης κατέχουν το γονίδιο p53, ο παράγοντας NFκB και η κινάση PI3K. Το γονίδιο p53 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος

17 και το πρωτεϊνικό του προϊόν είναι παρόν σε όλους σχεδόν τους φυσιολογικούς ιστούς. Στα φυσιολογικά κύτταρα το p53 ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδά του αυξάνουν όταν συμβαίνουν βλάβες στο DNA και εμποδίζουν το κύτταρο να εισέλθει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας έτσι αρκετό χρόνο ώστε να πραγματοποιηθεί η επιδιόρθωση του DNA. Με αυτόν τον τρόπο το p53 δρα περιορίζοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η απώλεια του p53 οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης, με έναν μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός (Ghobrial et al., 2005; Benchimol S., 2001).

Ο NFκB είναι ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων και εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης, την καρκινογένεση, τη φλεγμονή, ενώ διαδραματίζει ρόλο σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα. Πιστεύεται πως έχει τόσο αντι – αποπτωτική όσο και προ – αποπτωτική δράση, εξαρτώμενη από τη φύση του ερεθίσματος παρά από την προέλευση του ιστού (Ghobrial et al., 2005; Benchimol S., 2001).

Η κινάση PI3K κατέχει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση μονοπατιών θεμελιωδών για την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική κίνηση και την νεοαγγείωση. Συγκεκριμένα, παράγοντες επιβίωσης ενεργοποιούν τον διαμεμβρανικό υποδοχέα τυροσίνης κινάσης. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης PI3K. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης σερίνης – θρεονίνης Akt. Η τελευταία φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad και την κασπάση 9. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αναστολή της απόπτωσης (Ghobrial et al., 2005; Benchimol S., 2001).

Τέλος, τόσο το ενδογενές όσο και το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης υπόκεινται σε καταστολή από μια οικογένεια αναστολέων της απόπτωσης γνωστή με το όνομα IAP (Inhibitors of Apoptosis, αναστολείς της απόπτωσης). Τα μέλη της μπορούν να αναστείλουν άμεσα ή έμμεσα τις κασπάσες. Διάφορα μέλη της οικογένειας IAP έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο όπως οι αναστολείς XIAP, c – IAP – 1, c – IAP – 2, οι οποίοι αναστέλλουν άμεσα τις κασπάσες 3, 7, 9. Η πρωτεΐνη Smac / Diablo συνδεδεμένη με τα μέλη της οικογένειας IAP οδηγεί στην αναστολή τους με αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης (Watson & Fitzpatrick, 2005). Στην εικόνα 6 περιγράφονται αναλυτικά τα δύο μονοπάτια της απόπτωσης.



**Εικόνα 6:** Τα μονοπάτια της απόπτωσης: το εξωγενές ή εξαρτώμενο από τους υποδοχείς θανάτου μονοπάτι (αριστερά) ενεργοποιείται από μέλη της υπερ – οικογένειας υποδοχών θανάτου όπως ο Fas. Δέσμευση του Fas – L με τον Fas επιφέρει τριχοτόμηση του υποδοχέα, πρόσληψη των ειδικών προσαρμοστικών πρωτεϊνών (FADD) και μορίων προκασπάσης 8. Το σύστημα πρωτεϊνών DISC επιδρά στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8, με το c – FLIP. Η ενεργοποιημένη κασπάση 8 με τη σειρά της ενεργοποιεί το Bid, ένα προ - αποπτωτικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl – 2 , που αποτελούν ένα σταυροδρόμι μεταξύ εξωγενούς και ενδογενούς μονοπατιού. Οξειδωτικά, τοξικές ουσίες, φάρμακα ή ιονίζουσα ακτινοβολία, που όλα προκαλούν υπερπαραγωγή ROS και σηματοδότηση stress, μπορούν να ενεργοποιήσουν το ενδογενές μονοπάτι (δεξιά). Το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποιείται από τη ζημιά του DNA από τη δραστηριότητα του p53 γονιδίου. Τα ερεθίσματα του θανάτου έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c, Apaf – 1 και άλλων προ - αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα. Η διατήρηση ή η διατάραξη του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης εξαρτάται από την αναλογία των προ - αποπτωτικών (Bax) και αντι – αποπτωτικών (Bcl – 2) μελών της οικογένειας Bcl – 2, προκαλώντας ή προλαμβάνοντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Τα μόρια κυτόχρωμα c, Apaf – 1, dATP και προκασπάση 9 συνεργάζονται για τον σχηματισμό υπερμοριακού συμπλέγματος, που ονομάζεται αποπτόσωμα, το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση 9 με αυτοκατάλυση. Και οι δύο ενεργοποιημένες κασπάσες 8 και 9 διασπούν την προκασπάση 3 και παράγουν την κασπάση 3, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί άλλες κασπάσες και διασπά κυτταρικούς στόχους. Η δραστηριότητα των κασπασών ελέγχεται από την οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης IAP (Inhibitors of Apoptosis Protein).

### 1.3.4. Κασπάσες

Τόσο το πρώτο όσο και το δεύτερο μονοπάτι απόπτωσης καταλήγουν σε ένα τελικό κοινό μονοπάτι, το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες, με τελικό αποτέλεσμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το όνομα κασπάση βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες των πρωτεασών, οι οποίες σχετίζονται με την πρωτεάση ICE (interleukine converting enzyme: ένζυμο μετατροπής της ιντερλευκίνης). Βασικό ρόλο στην δράση των κασπασών παίζει ένα αμινοξύ Cys που βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο. Επίσης, οι κασπάσες διασπούν το υπόστρωμα σε θέσεις μετά από ένα αμινοξύ Asp (Grutter M., 2000; Μπάμπας Ε., 2009).

#### 1.3.4.1. Δομή και μηχανισμός κασπασών

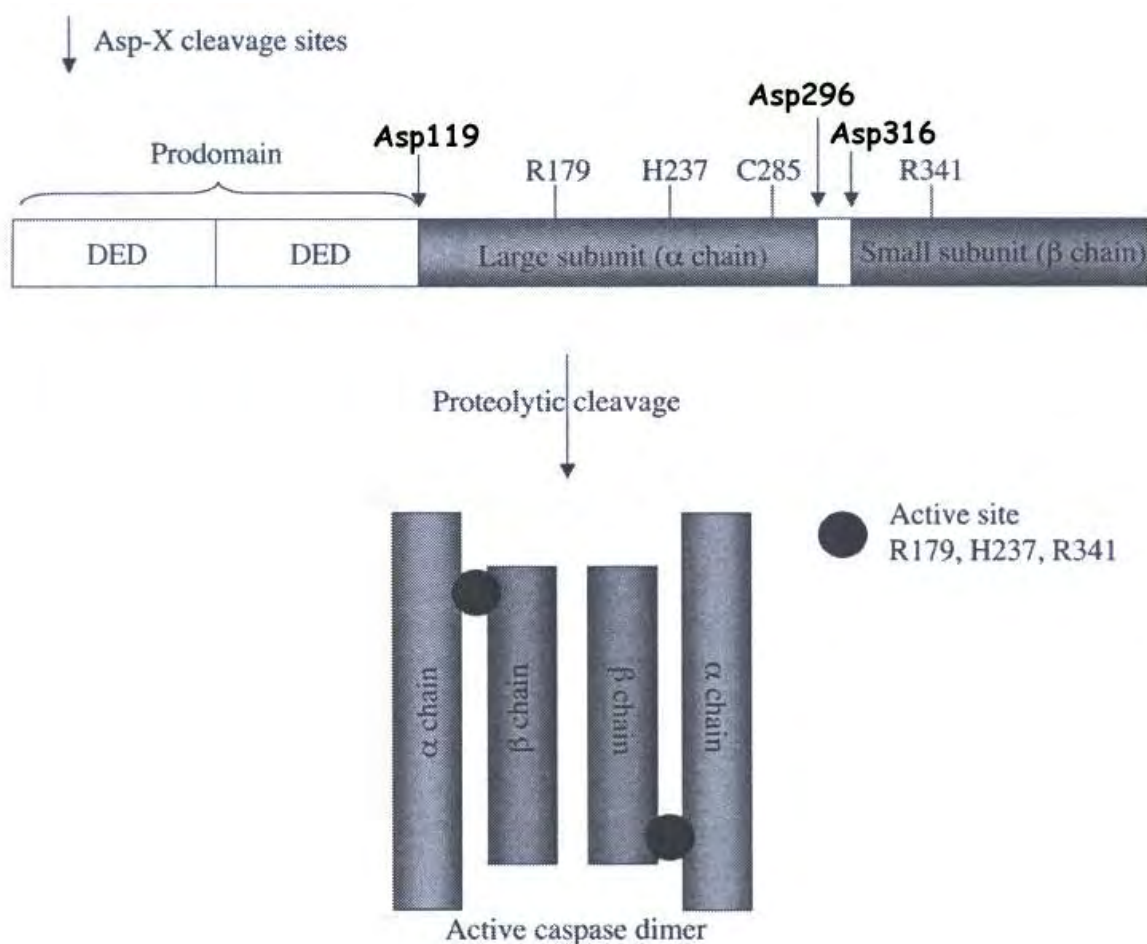
Όπως και πολλές άλλες πρωτεάσες, οι κασπάσες σχηματίζονται ως ανενεργά προ-ένζυμα των 30-50 kDa (ζυμογόνα) και ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική διαδικασία. Τα προ-ένζυμα αποτελούνται από 3 περιοχές: μια προ-περιοχή (pro-domain) στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, μια μεγάλη α-υπομονάδα (17-12 kDa) και μια μικρή β-υπομονάδα (10-13 kDa). Τα προένζυμα όλων των κασπασών περιέχουν τρία καλά συντηρημένα αμινοξέα Asp (Asp119, Asp296, Asp316), τα οποία αποτελούν θέσεις διάσπασης, είτε με αυτοπρωτεόλυση είτε από άλλες κασπάσες. Το μόριο που προκύπτει μετά τη διάσπαση είναι μια ετεροδιμερής κασπάση, η οποία αποτελείται μόνο από τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα. Δύο ετεροδιμερή στη συνέχεια ευθυγραμμίζονται για να σχηματίσουν ένα τετραμερές με δύο καταλυτικά κέντρα (Μπάμπας Ε., 2009) (Εικόνα 7).

Οι κασπάσες χρησιμοποιούν έναν τυπικό μηχανισμό πρωτεασών με μια καταλυτική δυάδα για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Η πυρηνόφιλη θειόλη ενός αμινοξέος Cys σχηματίζει έναν ομοιοπολικό θειοακυλικό δεσμό με το υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Επίσης, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος μιας ιστιδίνης εμπλέκεται στην κατάλυση και αυτό διευκολύνει την υδρόλυση του αμιδικού δεσμού σε μια μορφή κατάλυσης οξέος/βάσης.

Το ειδικό χαρακτηριστικό των κασπασών είναι η μεγάλη εξειδίκευσή τους στη διάσπαση. Η διάσπαση συμβαίνει στο C-τελικό άκρο μετά από ένα αμινοξύ Asp του πρωτεϊνικού υποστρώματος και απαιτεί ένα άλλο αναγνωριστικό στοιχείο αποτελούμενο από μια συγκεκριμένη αλληλουχία τουλάχιστον τριών αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της θέσης



διάσπασης. Οι διάφορες κασπάσες διαφέρουν σημαντικά στην ειδίκευση διάσπασης και γι' αυτόν το λόγο έχουν πολύ διαφορετικές πρωτεΐνες ως υποστρώματα (Donepudi & Grutter, 2002).

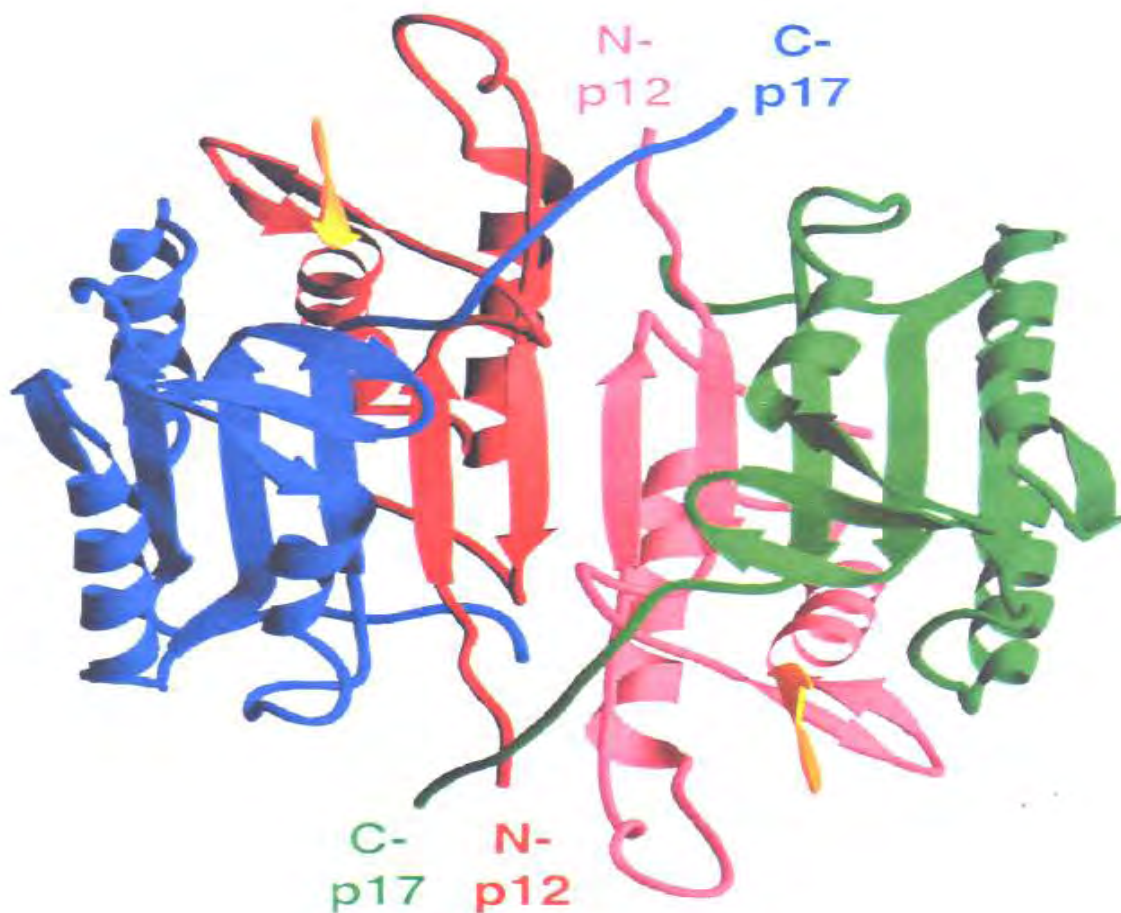


**Εικόνα 7:** Η πρωτεολυτική επεξεργασία μιας ανενεργής προκασπάσης με αυτοπρωτεόλυση ή από άλλες κασπάσες, επάγει διάσπαση σε τρεις κοινές θέσεις των κασπασών (Asp119, Asp296, Asp316). Η N-τελική προ-περιοχή (pro-domain) απομακρύνεται και οι άλλες δυο υπομονάδες (α και β αλυσίδες) δημιουργούν την ενεργή κασπάση, η οποία είναι ένα τετραμερές με δυο ενεργές θέσεις. Για τη δημιουργία της ενεργούς θέσης συμμετέχουν κατάλοιπα και από τις δυο υπομονάδες, τα R179, H237 της μεγάλης υπομονάδας, και το R341 της μικρής ( Donepudi & Grutter, 2002).

Οι κασπάσες αποτελούνται από ετεροδιμερή των 10 και 20 kDa, τα οποία συσσωρεύονται προς σχηματισμό ενός τετραμερούς. Έχουν ταυτοποιηθεί 14 μέλη της οικογένειας των κασπασών, εκ των οποίων 7 συντελούν στη διαδικασία της απόπτωσης. Οι κασπάσες οι οποίες θεωρείται πως διαδραματίζουν ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης είναι οι κασπάσες 2, 3, 6, 7, 8, 9 και 10 σε αντιδιαστολή με τις κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Ghobrial et al., 2005; Vermeulen et al., 2005; Voutsadakis I., 2000). Οι κασπάσες 2, 8, 9 και 10 θεωρούνται εναρκτήριοι κασπάσες, ενώ η κασπάση 3 και σε μικρότερο βαθμό οι κασπάσες 6 και 7 λειτουργούν ως κασπάσες τελεστές. Η κασπάση 9 θεωρείται η κυρίως κασπάση στο ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι και η κασπάση 8 είναι το κλειδί της έναρξης της απόπτωσης μέσω των υποδοχέων (Μπάμπας Ε., 2009). Ο ρόλος της κασπάσης 2 παραμένει αινιγματικός και αντιφατικός.

#### **1.3.4.2. Κασπάση 3**

Η κασπάση 3 είναι γνωστή επίσης και ως CPP – 32, Yama ή Apopain. Είναι η κύρια κασπάση τελεστής. (Porter & Janicke, 1999). Διασπά πλήθος κυτταρικών μορίων, τα οποία περιέχουν το μοτίβο αμινοξέος DEVD, όπως η πολυμεράση πολύ – ADP ριβόζης (PARP), 70 kD πρωτεΐνη της U1 – ριβονουκλεοπρωτεΐνης και μια υπομονάδα του DNA της εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης. Η κασπάση 3 ενεργοποιείται μετά από διάσπαση από την κασπάση 8 ή 9 αλλά όχι από τη 2 (Porter & Janicke, 1999). Η παρουσία της κασπάσης 3 στα κύτταρα διαφορετικών γενεών υποδηλώνει ότι αυτή είναι ένα κλειδί – ένζυμο που χρειάζεται για την εκτέλεση της απόπτωσης.

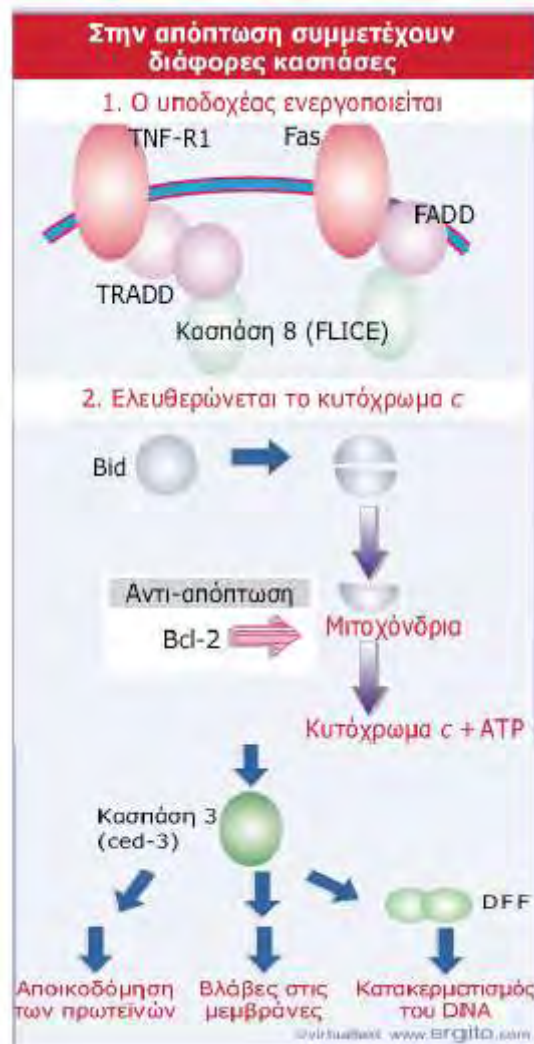


**Εικόνα 8:** Δομή της ενεργής κασπάσης 3. Αποτελείται από 4 υπομονάδες: δύο μεγάλες (p17) και δύο μικρές (p12). Στο σημείο όπου είναι το βέλος, βρίσκεται το ενεργό κέντρο. Η τετραμελής κασπάση έχει 2 ενεργά κέντρα (Chang & Yang, 2000).

#### 1.3.4.3. Κασπάση 8

Η κασπάση 8 είναι γνωστή και ως FLICE, MACH και Mch5. Είναι απαραίτητη στο εξωγενές μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου. Οχτώ διαφορετικές ισομορφές της έχουν περιγραφεί, η καθεμία με διαφορετικές λειτουργίες (Μπάμπας Ε., 2009). Μόνο οι πρωτεΐνες των ισομορφών α και β έχουν ανιχνευθεί ενδοκυτταρικά. Ενεργοποίηση της κασπάσης 8 απελευθερώνει δύο ενεργές υπομονάδες, p18 και p10, στο διαλυτό κυτταρόπλασμα, οι οποίες ενεργοποιούν επιπρόσθετα κασπάσες που διασπούν άλλα υποστρώματα συγγενικά της απόπτωσης, όπως πολυμεράση πολύ – ADP ριβόζης (PARP), 70 kD πρωτεΐνη της U1 –

ριβονουκλεοπρωτεΐνης και μια υπομονάδα DNA της πρωτεϊνικής κινάσης (Μπάμπας Ε., 2009) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Η απόπτωση μπορεί να πυροδοτηθεί από ενεργοποιητικούς υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου. Οι κασπάσες με δράση πρωτεάσης ενεργοποιούνται σε δύο στάδια στο μονοπάτι. Η κασπάση 8 ενεργοποιείται από τον υποδοχέα. Η ενεργοποίησή της οδηγεί στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η απόπτωση μπορεί να ανασταλεί σε αυτό το στάδιο από την Bcl – 2. Το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί ένα μονοπάτι, το οποίο ενέχει περισσότερες κασπάσες.

#### **1.3.4.4. Κασπάση 9**

Η κασπάση 9 είναι επίσης γνωστή και ως ICE - LAP6 και Mch6. Είναι ένας παράγοντας κλειδί στο μιτοχονδριακό μονοπάτι θανάτου (ενδογενές μονοπάτι). Μετά την αποδέσμευση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c, η κασπάση 9 ενεργοποιείται λόγω της σύνδεσής της με το σύμπλεγμα του Araf1 (αποπτωτική πρωτεάση ενεργοποιητικός παράγοντας 1) και του κυροχρώματος c. Η ενεργή κασπάση 9 με τη σειρά της ενεργοποιεί την προ - κασπάση 3 προωθώντας την εκδήλωση κάποιων κλασικών χαρακτηριστικών της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση της κασπάσης 9 μπορεί να ρυθμιστεί με πρωτεϊνική φωσφορυλίωση. Η καταλληλότερη ακολουθία αναγνώρισης του κυτταρικού διαχωρισμού για την κασπάση 9 είναι η LEHD. Η ικανότητα της κασπάσης 9 να συνδέεται τόσο με προ - αποπτωτικές όσο και με αντι - αποπτωτικές πρωτεΐνες επιπρόσθετα με τη ρυθμιστική λειτουργία κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής ανάπτυξης υποδηλώνει ότι η κασπάση 9 είναι ρυθμιστής - κλειδί της απόπτωσης in vivo (Μπάμπας Ε., 2009).

### **1.4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου στις σύγχρονες κοινωνίες. Το έτος 2000 διαγνώστηκαν δέκα εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου, ενώ έξι εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως είχαν ως αιτία τον καρκίνο. Στις Η.Π.Α. κάθε χρόνο ενάμιση εκατομμύρια άτομα πληροφορούνται πως πάσχουν από κάποια μορφή καρκίνου (Robbins & Cotran, 2003).

#### **1.4.1. Κύρια στάδια της καρκινογένεσης**

Η καρκινογένεση είναι ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας. Αιτίες του καρκίνου θεωρούνται διάφορα καρκινογόνα όπως οι ιοί, διάφορα χημικά και η ακτινοβολία καθώς και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι αυθόρμητες μεταλλάξεις. Τα γενικά στάδια τα οποία θεωρείται ότι ακολουθεί η καρκινογενετική διαδικασία είναι η έναρξη (initiation), η προαγωγή (promotion) και η πρόοδος (progression) (Baer – Dubowska et al., 2006; Bode & Dong, 2006; Trosko J. E., 2006).

Αρχικά, για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πραγματοποίηση μεταλλάξεων στο DNA. Στο στάδιο της έναρξης (initiation)

συμβαίνει αντίδραση μεταξύ του καρκινογόνου και του DNA του κυττάρου, που οδηγεί στη δημιουργία μεταλλάξεων. Το στάδιο αυτό είναι μη αντιστρεπτό, ωστόσο μόνο κάτω από κάποιες προϋποθέσεις μπορεί το κύτταρο σε επόμενο στάδιο να εξελιχθεί σε καρκινικό. Ακολουθεί το στάδιο της προαγωγής (promotion) κατά το οποίο μπορεί να συμβαίνουν συνεχόμενες μεταλλάξεις, που προκύπτουν από την έκθεση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα και συνήθως εξελίσσεται πολύ αργά. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ρύθμισης της απόπτωσης και του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Στο στάδιο της προαγωγής μπορεί να συμβεί κλωνική επέκταση των μεταλλαγμένων κυττάρων, τα οποία έχουν χάσει κάποιες από τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό αφού απαιτεί έναν προαγωγέα, ο οποίος όταν αποσυρθεί, σταματά η ανάπτυξη του καρκίνου. Στο στάδιο της προόδου (progression) που ακολουθεί, λαμβάνει χώρα η διάδοση του καρκίνου. Τα κύτταρα αποκτούν τον καρκινικό φαινότυπο, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και έχουν χάσει την ικανότητα διαφοροποίησης, την ικανότητα να επικοινωνούν με γειτονικά κύτταρα, ενώ έχουν την ικανότητα να διηθούνται και να μεθίστανται. Το στάδιο αυτό δεν είναι αντιστρεπτό, καθώς πρόκειται για μόνιμο μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά (Σπανού Χ., 2010).

#### **1.4.2. Καρκίνος και απόπτωση**

Η καρκινογένεση είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων τόσο σε γενετικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο φαινότυπου. Τα κακοήγη νεοπλασμάτα έχουν διάφορα χαρακτηριστικά όπως η ανεξέλεγκτη αύξηση, η ικανότητα να διηθούν παρακείμενους ιστούς και να μεθίστανται σε απομακρυσμένες περιοχές. Η ανεξέλεγκτη αύξηση των καρκινικών κυττάρων προέρχεται από τη σταδιακή απόκτηση μεταλλάξεων στα γονίδια, τα οποία ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση ή ελέγχουν την απόπτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται χωρίς φυσιολογικούς περιορισμούς (Μπάμπας Ε., 2009).

Στην παθογένεια του καρκίνου εμπλέκονται τρεις κατηγορίες γονιδίων. Τα ογκογονίδια είναι τροποποιημένες μορφές των φυσιολογικών γονιδίων που ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια και ρυθμίζουν τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια των οποίων τα προϊόντα αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τέλος, τα μεταλλακτικά γονίδια διατηρούν την ακεραιότητα

του γονιδιώματος και την πιστότητα της αντιγραφής του DNA (Κουλούκουσα και συν., 2003).

Η συσσώρευση τόσο πολλών κυττάρων στον καρκίνο είναι το αποτέλεσμα της ανεξέλεγκτης αύξησης του αριθμού των κυττάρων ή/και της ελαττωμένης απόπτωσης. Τόσο οι μεταλλάξεις, που οδηγούν σε αδρανοποίηση των προ-αποπτωτικών γονιδίων, όσο και αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, οδηγούν τελικά σε ελαττωμένη απόπτωση. Κάτω από αυτό το πρίσμα οι μεταλλάξεις στο προ-αποπτωτικό γονίδιο p53 και οι αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl – 2, αποτελούν αντικείμενο ευρείας μελέτης όσον αφορά το ρόλο τους στη βιολογία του καρκίνου (Sellers & Fisher, 1999; Fadeel & Orrenius, 2005).

Το γονίδιο p53 έχει ογκοκατασταλτική δράση, κατέχοντας ιδιαίτερο ρόλο στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Αν και ο μηχανισμός δια μέσου του οποίου συμβαίνει αυτό, δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει πρόσφατα διαπιστωθεί ότι το p53 συντελεί στην ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Μεταλλάξεις στο p53 προκαλούν μείωση της μεταγραφής του Bax, ελάττωση της απόπτωσης και της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία. Έτσι, μετάλλαξη του γονιδίου p53 έχει ως αποτέλεσμα την αναίρεση της κατασταλτικής δραστηριότητάς του στην αύξηση του όγκου (Robbins & Cotran, 2003; Fadeel & Orrenius, 2005). Το γονίδιο p53 εξαλείφεται ή μεταλλάσσεται στο 70 – 80 % των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και άλλους όγκους (Lowe & Lin, 2000).

Το πρωτοογκογονίδιο c – Myc αποδείχθηκε πως κατέχει κεντρική θέση στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, το μεταβολισμό, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση και την καρκινογένεση. Επάγει την απόπτωση δια μέσου p53 εξαρτώμενων και p53 ανεξάρτητων μονοπατιών. Και τα δύο μονοπάτια διευκολύνουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Lowe & Lin, 2000; Dang C., 1999). Το c – Myc και το Bcl - 2 συνεργάζονται στην ογκογένεση. Συγκεκριμένα το c - Myc προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ το Bcl – 2 αποτρέπει τον κυτταρικό θάνατο. Αυτό είναι ένα από τα πολλά παραδείγματα συνεργασίας μεταξύ δύο ή περισσότερων ογκογονιδίων στην καρκινογένεση (Lowe & Lin, 2000; Dang C., 1999; Hoffman et al., 2002).

### **1.4.3. Καρκίνος του ήπατος**

Ο καρκίνος του ήπατος είναι παγκοσμίως από τους πιο συχνούς καρκίνους και παραμένει μια σημαντική αιτία θανάτου. Αποτελεί τον πέμπτο σε συχνότητα καρκίνο και τον τρίτο σε συνολικό ποσοστό θνησιμότητας (Okuda, 2000; Kew, 2002; Jemal et al., 2005). Οι περιπτώσεις καρκίνου του ήπατος έχουν αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες σε περιοχές όπως η Ευρώπη, οι Η.Π.Α. και η Ασία (Marrero JA, 2006). Ο καρκίνος του ήπατος σχετίζεται με διαιτητικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ έχει ποικίλη συχνότητα σε διάφορους πληθυσμούς, γεωγραφικές περιοχές όπως και ανάμεσα στα δύο φύλα. Εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες χωρίς να είναι απόλυτα διευκρινισμένος ο λόγος. Πιθανολογείται η συχνότερη έκθεση των αντρών σε ηπατοτρόπους ιούς και η επίδραση ορμονών του φύλου αν και γενικά η αιτιολογία παραμένει άγνωστη. (Kew MC., 2002). Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος αποτελούν η λοίμωξη από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C, η κίρρωση του ήπατος, τα μεταβολικά νοσήματα του ήπατος, το οινόπνευμα, οι αφλατοξίνες, χημικοί παράγοντες κ.α. (Νικοπούλου Α., 2008; Yuspa & Poirier, 1988).

## **1.5. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

### **1.5.1. Γενικά**

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το 80 % περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, κάπνισμα, διατροφή, εργασιακό περιβάλλον (Baer – Dubowska et al., 2006; De Flora & Ferguson, 2005). Με βάση τις επιδημιολογικές μελέτες ο Sporn για πρώτη φορά έθεσε τον όρο χημειοπροστασία του καρκίνου. Χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων (Hong & Sporn, 1997). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν ότι υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Σήμερα η χημειοπροστασία θεωρείται μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al., 2004; Surch, 2003).

Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση,



αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001; Smith et al., 2005). Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών προσεγγίσεων: α) μείωση της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα μέσω ελέγχου του εργασιακού περιβάλλοντος και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής, β) εντοπισμός των πληθυσμιακών ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου εξαιτίας γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, έτσι ώστε να γίνονται σε αυτούς συχνές κλινικές εξετάσεις και γ) εξασφάλιση της χημειοπροστασίας με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Από αυτές τις τρεις προσεγγίσεις, πολύ σημαντική θεωρείται η χημειοπροστασία γιατί οι δύο πρώτες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση (Stoner et al., 1997; Shureiqi et al., 2000).

### **1.5.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Ο Wattenberg το 1985 έκανε την πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων στηριζόμενος στα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών σε πειραματόζωα. Στην πορεία των χρόνων, πολλές μελέτες έχουν εμπλουτίσει την αρχική τους ταξινόμηση (Kelloff et al., 2004, 2000; Shukla et al., 2004; De Flora et al., 2001).

Έχει ήδη αναφερθεί πως η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου βασίζεται στην πρόιμη προστασία πριν την εμφάνισή του (primary prevention) (De Flora & Ferguson, 2005; Smith et al., 2005) και στη μετέπειτα προστασία μετά τη διάγνωση, με σκοπό την αναστροφή και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention). Έχει προταθεί και η τριτοβάθμια χημειοπροστασία, η οποία αφορά τους ασθενείς μετά τη θεραπεία του καρκίνου (De Flora & Ferguson, 2005; Kelloff et al., 2005). Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, είναι πολλοί και κατατάσσονται τόσο στην πρόιμη όσο και στη μετέπειτα προστασία.

Συνήθως, οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες έχουν πλειοτροπικές δράσεις δρώντας με ποκίλους μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας με ποικίλους τρόπους είτε μεταξύ τους είτε με τους καρκινογόνους παράγοντες. Ακόμη, οι μηχανισμοί δράσης τους επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή τους, η βιοδιαθεσιμότητά τους, ο τρόπος εισαγωγής τους στον οργανισμό (De Flora & Ferguson, 2005; Kelloff et al., 2005).

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τους αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου, τους παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου και τους παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005).

#### ***A) Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου***

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι παρεμποδιστές σχηματισμού των νιτροζαμίνων από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον. Ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι τα αναγωγικά οξέα (ασκορβικό οξύ), οι φυτικές πολυφαινόλες (καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ) και διάφορα αμινοξέα (προλίνη και θειοπρολίνη) (Σπανού Χ., 2010).

#### ***B) Παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου***

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) δρουν κυρίως στο στάδιο της έναρξης αλλά και στο στάδιο της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το μεταβολισμό των ξеноβιοτικών ουσιών, αναστέλλουν τη δράση γενοτοξικών παραγόντων, εξουδετερώνουν ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες και ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (De Flora & Ferguson, 2005).

Στους παράγοντες που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κατατάσσονται οι αναστολείς του κυτοχρώματος P450 και οι επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II. Κάποια χημικά προκαρκινογόνα δεν είναι άμεσα καρκινογόνα, αλλά πρέπει να μεταβολιστούν για να δώσουν τα τελικά καρκινογόνα (Reddy et al., 2003). Ο μεταβολισμός γενικά διάφορων ουσιών, ο οποίος είτε πρόκειται να οδηγήσει στην ενεργοποίηση προκαρκινογόνων είτε στην απενεργοποίησή τους, γίνεται μέσω των αντιδράσεων της φάσης I και II. Οι αντιδράσεις της φάσης I αλλάζουν ή απομακρύνουν ενεργές ομάδες από το αρχικό μόριο της ουσίας μέσω οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Ένα από τα κυριότερα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές, είναι το κυτόχρωμα P450. Οι αντιδράσεις της φάσης II προσθέτουν άλλες ομάδες στο μόριο μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ,θειικό οξύ κλπ (Shukla et al., 2004). Ακόμη, στους παράγοντες που διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα κατατάσσονται οι επαγωγείς των ενζύμων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA και οι αναστολείς των τελομερασών, ενώ στους

παράγοντες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατατάσσονται εκείνοι που επηρεάζουν την έκφραση και λειτουργία των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (De Flora & Ferguson, 2005).

### ***Γ) Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης***

Οι παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης (suppressing agents) δρουν στα στάδια της προαγωγής και της προόδου της καρκινογένεσης (De Flora & Ferguson, 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμίνων, οι επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης, οι ρυθμιστές των σηματοδοτικών μονοπατιών, οι ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων, οι αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων, οι επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας, οι παράγοντες αποκατάστασης της ανοσολογικής απάντησης, οι επαγωγείς της απόπτωσης, οι επιδιορθωτές της ανισορροπίας της μεθυλίωσης του DNA, οι αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, οι αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και οι αναστολείς της αγγειογένεσης (De Flora & Ferguson, 2005). Επίσης, σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι αναστολείς των τοποϊσομερασών, τα οποία είναι ενζυμα σημαντικά για την κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να καθυστερήσουν ή να εμποδίσουν τα κύτταρα να αποκτήσουν τον καρκινικό φαινότυπο.

#### **1.5.3. Φυσικοί και διατροφικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες**

Η χρησιμοποίηση των φυσικών και διατροφικών προϊόντων ως η κυριότερη πηγή φαρμακευτικών στοιχείων είναι καθιερωμένη. Η φυσική παρουσία των βιοδραστικών ενώσεων ως συστατικά της διατροφής είναι το κύριο χαρακτηριστικό που καθιστά τις διατροφικές φυτοχημικές ενώσεις πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Η προσέγγιση της χημειοπροστασίας του καρκίνου βασίζεται κυρίως στα φυσικά και διατροφικά βιοδραστικά στοιχεία. Πολλά τρόφιμα έχουν μελετηθεί για τις προστατευτικές τους ιδιότητες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες χημειοπροστασίας απέναντι σε διάφορες μορφές καρκίνου (Kelloff et al., 2000; Shukla et al., 2004; Surch, 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). 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.

## 1.6. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Lathyrus*

Το γένος *Lathyrus* ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae/Fabaceae* και είναι από τις σημαντικότερες ομάδες φυτών αυτής της οικογένειας. Αποτελείται από περίπου 187 είδη και υποείδη. Είδη αυτού του γένους χρησιμοποιούνται και ως καρποδοτικά και ως κτηνοτροφικά φυτά. Ως κέντρα καταγωγής θεωρούνται η περιοχή της Μεσογείου και η Κεντρική και Ανατολική Ασία (Σπανού Χ., 2010). Το είδος *Lathyrus sativus* είναι το κοινό εδώδιμο λαθούρι που καλλιεργείται για τα σπέρματά του, τη γνωστή στο εμπόριο φάβα. Το είδος *Lathyrus clymenum* διαφέρει από το *Lathyrus sativus* φύεται μόνο στη Σαντορίνη και παράγει τη χαρακτηριστική φάβα Σαντορίνης.

Το είδος *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus* αποτελεί ένα άγριο είδος λαθουριού γνωστό από την αρχαιότητα. Στις αποθήκες των μινωικών παλατιών, που έφεραν στο φως οι αρχαιολογικές ανασκαφές στην Κρήτη, βρέθηκαν πολλά πιθάρια με αποθηκευμένους σπόρους, που αναγνωρίστηκαν, ενώ διαβάστηκαν και τα μινωικά τους ονόματα στη Γραμμική Β', σε πινακίδες αυτών των αποθηκών, με την καταγραφή του περιεχομένου τους. Ανάμεσα στους σπόρους ήταν και καρποί από λαθούρι. Το αρχαίο όνομα του λαθουριού είναι 'λάθυρος'. Η καταγραφή του στους μινωικούς καταλόγους των αποθηκών, που έχουν εντοπιστεί σπόροι, γίνεται με το συλλαβόγραμμα (-λα-) και συμβολίζεται με ένα σχέδιο που μοιάζει με αλέτρι (άροτρο) (Hooker, 1994). Το *Lathyrus laxiflorus* είναι αναρριχώμενο φυτό, με βράκτια φύλλα μωβ άνθος και καρπό χέδρωπα.



**Εικόνες 10 και 11:** Το φυτό *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*.

Το *Lathyrus laxiflorus* είναι φυτό πλούσιο σε φλαβονοειδή και συγκεκριμένα σε γλυκοσιδικά παράγωγα της κερκετίνης και της καμπερόλης. Τα φλαβονοειδή αυτά αποτελούν δύο από τους πιο κοινούς αντιπροσώπους της κατηγορίας, οι οποίοι φημίζονται για τις σπουδαίες βιολογικές – φαρμακολογικές δράσεις τους (Αληγιάννης Νεκτάριος, 2009). Ειδικότερα, το *Lathyrus laxiflorus* (φύλλα, καρποί και βλαστοί) αποτελείται από Quercetin – 3 – O – rhamnoside, Quercetin – 3 – O – rutinoside, Quercetin – 3 – O – glucoside, Kaempferol – 3 – O – rhamnoside, Kaempferol – 3 – O – rutinoside (Harborne, 1965; Harborne et al., 1971; Kupicha, 1983; Ranabahu, 1992; Reynaud et al., 1981; Ranabahu & Harborne, 1993). Επιπλέον, περιέχει καφεϊκό οξύ μόνο του καθώς και σε συνδυασμό με Quercetin – 3 – O – glucoside και σε συνδυασμό με Kaempferol – 3 – O – [6 – O – (3 – O – rhamnopyranose) rhamnopyranose] galactopyranose.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της φυτοχημικής δομής του *Lathyrus laxiflorus* είναι η ύπαρξη προανθοκυανιδών στα φύλλα του, ουσιών που δεν αναφέρονται σε κανένα άλλο είδος του γένους *Lathyrus*. Επίσης, περιέχει λουτεολίνη και συγκεκριμένα Luteolin – 7 – glucuronide και ακόρεστα οξέα στους σπόρους του (USFA) όπως λινολεϊκό και λινολενικό

σε ποσοστό 16,5 % (Ranabahu & Harborne, 1993). Το ολεϊκό οξύ που υπάρχει στο *Lathyrus laxiflorus* υπολογίζεται στο 30,4 % περίπου. Τέλος, το *Lathyrus laxiflorus* αποτελείται και από τη φλαβόνη Apigenin – 6 – C- a – L – arabinopyranose – 8 – C – b –D – glucopyranose (Ranabahu & Harborne, 1993).

## 1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί τον πέμπτο σε συχνότητα καρκίνο και τον τρίτο σε συνολικό ποσοστό θνησιμότητας παγκοσμίως. Πολλές έρευνες έχουν γίνει για τις διατροφικές πολυφαινολικές ενώσεις των ψυχανθών, καθώς αυτές αποτελούν σημαντικούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες ιδιαίτερα σε ορισμένες μορφές καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στις βιοδραστικές πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε είδη του γένους *Lathyrus*. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης 2 εκχυλισμάτων (υδατικού και μεθανολικού) και 6 καθαρών πολυφαινολικών μορίων του *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus* στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του ήπατος.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. ΥΛΙΚΑ**

#### **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**

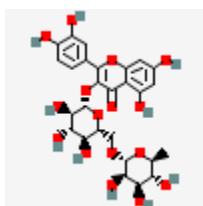
Για την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM high glucose) της εταιρείας Gibco (Η.Π.Α.), διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco), ορός βοδιού (Fetal bovine serum;) της εταιρείας Biochrom (Μ.Β.). Για τους αναδιπλασιασμούς των κυττάρων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

#### **2.1.3. Εκχυλίσματα και πολυφαινολικά καθαρά μόρια**

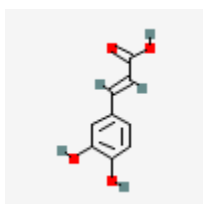
Τα εκχυλίσματα και τα πολυφαινολικά καθαρά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το ποώδες φυτό *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*. Απομονώθηκαν δύο εκχυλίσματα, ένα υδατικό και ένα μεθανολικό και τα παρακάτω έξι πολυφαινολικά καθαρά μόρια:

1. Kaempferol - 3 - o - rhamnoside
2. Quercetin - 3 - o - rhamnoside
3. Kaempferol - 3 - o - rutinoside
4. Quercetin - 3 - o - rutinoside
5. Caffeic acid
6. Apigenin - 6 - c - a - L – arabinopyranose - 8 - c - b - D – glucopyranose

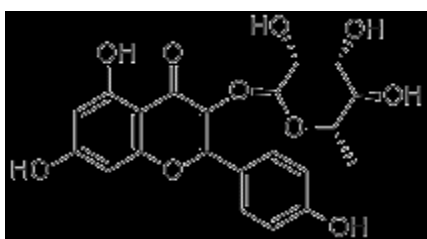




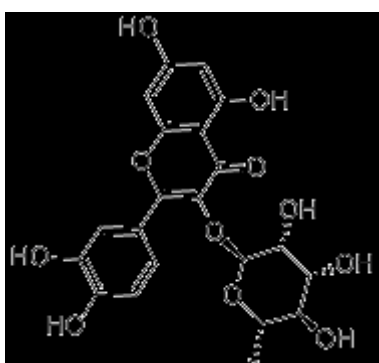
**Εικόνα 12:** Χημική δομή του Quercetin-3-O-rutinoside



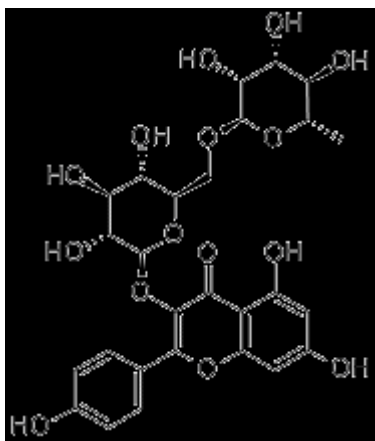
**Εικόνα 13:** Χημική δομή του Caffeic acid



**Εικόνα 14:** Χημική δομή του Kaempferol - 3 - o - rhamnoside



**Εικόνα 15:** Χημική δομή του Quercetin - 3 - o - rhamnoside



**Εικόνα 16:** Χημική δομή του Kaempferol - 3 - o – rutinoside

#### 2.1.4. Διαδικασία εκχύλισης

Η απομόνωση και επεξεργασία των φυτικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα υπέργεια τμήματα, τα σπέρματα και οι καρποί του φυτού μετά τη συλλογή τους αποξηράνθηκαν σε μεγάλους καλά αεριζόμενους χώρους, προστατευμένους από την ηλιακή ακτινοβολία και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διαλογή του φυτικού υλικού, μακρομερής τεμαχισμός και κονιορτοποίησή του σε ειδικό μύλο.

Ποσότητα των τμημάτων του φυτού χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v) σε ειδική συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE (accelerated solvent extractor). Η παρασκευή των εκχυλισμάτων έγινε υπό καθορισμένες συνθήκες (ποσότητα φυτικού υλικού, πίεση, θερμοκρασία, όγκος διαλύτη και διάρκεια εκχύλισης) με σκοπό την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας για να υπάρχει η δυνατότητα της συγκριτικής μελέτης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη (μεθανόλη ή νερό) επαναλήφθηκε τρεις φορές και διαρκούσε 48 h. Στα δοχεία εκχύλισης της συσκευής τοποθετήθηκαν 20 g του φυτικού υλικού και η κάθε εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε πίεση 1500 psi, σε θερμοκρασία 70°C και σε 100 mL όγκο διαλύτη. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων. Από τα μεθανολικά εκχυλίσματα ο διαλύτης απομακρύνθηκε με τη βοήθεια συσκευής απόσταξης υπό κενό, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα λυοφιλοποιήθηκαν μετά από ψύξη. Η ξηρή ποσότητα των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε νερό ή μεθανόλη για την πραγματοποίηση των in vitro δοκιμών.

## 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2

Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 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).

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

#### 2.2.2.1. Αρχή μεθόδου

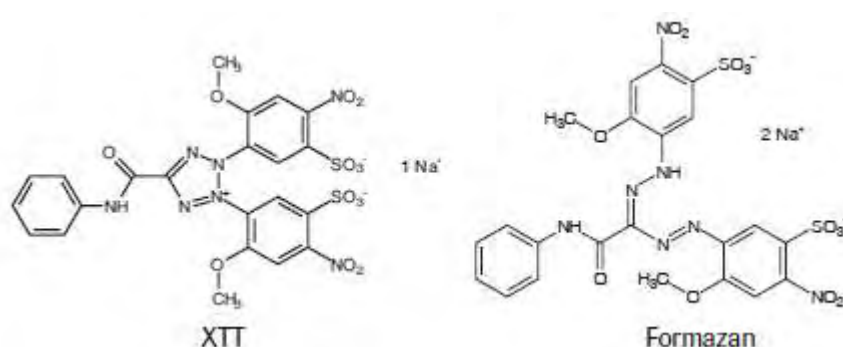
Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων του *Lathyrus laxiflorus* και των καθαρών πολυφαινολικών του ουσιών kaempferol – 3 – o – rhamnoside, quercetin – 3 – o – rhamnoside, kaempferol – 3 o – rutinoside, quercetin – 3 – o – rutinoside, caffeic acid και apigenin – 6 – C – a – L – arabinopyranose – 8 – C – b – D - glucopyranose 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.

#### 2.2.2.2 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 μίγμα 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 πολυφαινολικών 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 17:** Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτό formazan από ζωντανά κύτταρα.

### **2.2.3. Προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο ELISA Cell Death Detection.**

#### **2.2.3.1 Αρχή μεθόδου**

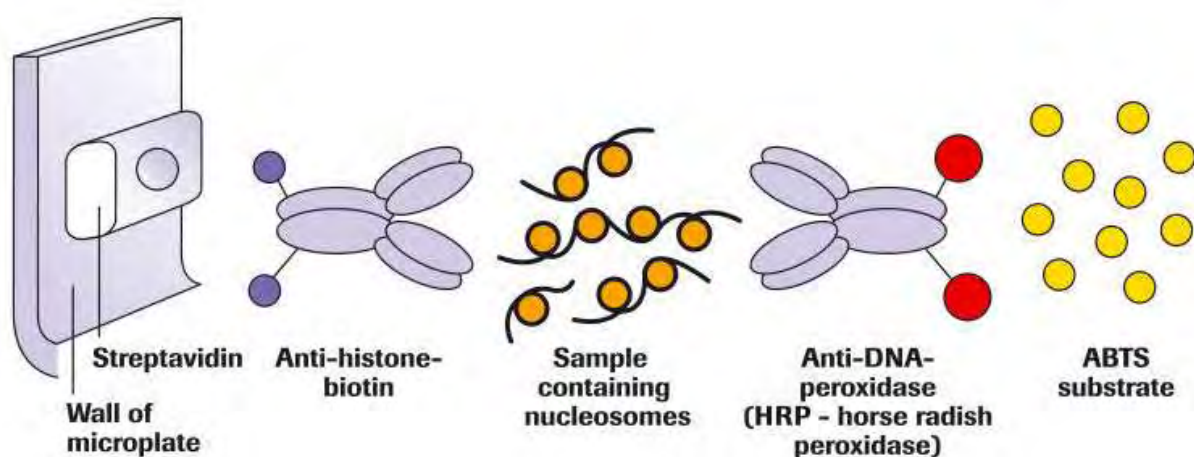
Για τον προσδιορισμό της προκαλούμενης από τα εκχυλίσματα από το *Lathyrus laxiflorus* απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα HepG2 χρησιμοποιήθηκε το kit 'ELISA cell death detection' της εταιρείας Roche. Η μέθοδος βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό των μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων που σχηματίζονται από την διάσπαση του DNA στα αποπτωτικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μια ποσοτική ενζυμική ανοσομέθοδος τύπου 'sandwich' στην οποία χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού τα οποία συνδέονται με DNA και ιστόνες. Έτσι, είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονο- και ολιγονουκλεοτιδίων στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενός κυτταρολύματος. Δηλαδή, γίνεται λύση των κυττάρων με ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, ακολουθεί απομόνωση του κυτταροπλασματικού κλάσματος του κυτταρολύματος με φυγοκέντρηση και προσθήκη του σε τριβλίο καλυμμένο με στρεπταβιδίνη. Προστίθεται στο τριβλίο αντίσωμα το οποίο συνδέεται με την στρεπταβιδίνη ενώ παράλληλα μπορεί να συνδέεται με τις ιστόνες H1, H2A, H2B, H3 και H4. Στη συνέχεια προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο μπορεί και συνδέεται με δίκλωνα και μονόκλωνα τμήματα DNA. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο περοξειδάση horse radish το οποίο μεταβολίζει την ένωση ABTS σε ένα χρωμογόνο προϊόν που απορροφά στα 405 nm.

#### **2.2.3.2. Πειραματική διαδικασία**

Αιώρημα καρκινικών κυττάρων HepG2 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε ένα τριβλίο με 96 θέσεις (10.000 κύτταρα/θέση). 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. Την επόμενη ημέρα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια προσθέτουμε το εκχύλισμα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Χρησιμοποιήθηκαν 2 συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος: 800 µg/ml και 1600 µg/ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 24 ώρες. Μετά την επώαση αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, προσθέτουμε 200 µl διαλύματος ρυθμιστικού διαλύματος για την λύση των κυττάρων και επωάζουμε για 1 ώρα στους 25°C σε plate shaker. Μετά την επώαση μεταφέρουμε το κυτταρόλυμα σε σωληνάκια του 1 ml και φυγοκεντρούμε στα 200Xg για 10 min. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 20 µl από το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικό κλάσμα) και 80 µl από το ανοσοαντιδραστήριο που περιέχει το 1<sup>ο</sup> και το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα σε τριβλίο με 96

θέσεις όπου κάθε θέση είναι καλυμμένη με στρεπταβιδίνη, και επωάζουμε για 2 ώρες στους 25°C με ανάδευση σε plate shaker. Μετά την επώαση αφαιρούμε το διάλυμα από κάθε θέση και κάνουμε 3 πλύσεις με 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης. Μετά προσθέτουμε σε κάθε θέση 100 μl διαλύματος ABTS και επωάζουμε με ανάδευση σε plate shaker για 10-20 λεπτά ή μέχρι να εμφανιστεί χρώμα. Στη συνέχεια προστίθεται 'stop solution' για να σταματήσει η αντίδραση και ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm με το λογισμικό Gen5 σε ELISA plate reader (Biotek). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με κυτταρόλυμα από κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε το εκχύλισμα (αρνητικός μάρτυρας) καθώς και δείγματα που περιείχαν το ανοσοαντιδραστήριο με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης. Η εξέταση της κάθε ουσίας έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε διπλά δείγματα. Ο παράγοντας εμπλουτισμού που δείχνει την αύξηση στη συγκέντρωση των μονο- και ολιγονουκλεοσωμάτων λόγω της απόπτωσης υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Παράγοντας εμπλουτισμού} = \text{O.D.}_{\text{δείγματος}} / \text{O.D.}_{\text{αρνητικού μάρτυρα}}$$



**Εικόνα 18:** Το σχήμα δείχνει την αρχή της μεθόδου ανίχνευσης του κυτταρικού θανάτου – ELISA plus.

## **2.2.4. Προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8, 9**

### **2.2.4.1. Αρχή της μεθόδου**

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δράσης των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2 μετά από επίδραση του εκχύλισματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* χρησιμοποιήθηκε το kit ‘Caspases Colorimetric assay’ της εταιρείας Roche. Σε αυτή την μέθοδο αρχικά γίνεται λύση των κυττάρων και στο κυτταρόλυμα προσδιορίζεται η δράση των κασπασών με την προσθήκη ενός πεπτιδίου που αποτελεί εξειδικευμένο υπόστρωμα για κάθε κασπάση. Το πεπτίδιο-υπόστρωμα είναι συνδεδεμένο με το χρωμοφόρο μόριο p-νιτροανιλίνη. Η διάσπαση του πεπτιδίου από τις κασπάσες απελευθερώνει την p-νιτροανιλίνη η οποία προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Η δράση των κασπασών είναι σε άμεση συνάρτηση με την απορρόφηση της p-νιτροανιλίνης.

### **2.2.4.2. Πειραματική διαδικασία**

Αιώρημα καρκινικών κυττάρων HepG2 σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS προστίθεται σε ένα φλάσκα των 75 cm<sup>2</sup>. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37<sup>0</sup>C και σε 5% CO<sub>2</sub> μέχρι να καλύψουν το 60-70% της φλάσκας. Στη συνέχεια αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Ταυτόχρονα προσθέτουμε το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1600 µg/ml και επωάζουμε τα κύτταρα με το εκχύλισμα για 24 ώρες. Μετά την επώαση συλλέγουμε τα κύτταρα με προσθήκη τρυψίνης 0,25% και τα μετρούμε με πλάκα κυτταρομέτρησης Neubauer. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στα 250Xg για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρούμε το υπερκείμενο και στο κυτταρικό ίζημα προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων (25 µl ανά 1X10<sup>6</sup> κύτταρα) και επωάζουμε για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 10.000Xg για 1 λεπτό. Μετά την φυγοκέντρωση το υπερκείμενο διατηρείται στον πάγο. Στο κυτταρόλυμα υπολογίζεται με την μέθοδο Bradford η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Μετά σε θέσεις ενός τριβλίου με 96 θέσεις προστίθενται 50 µl από το κυτταρόλυμα, 50 µl από 2X ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης και 5 µl του πεπτιδίου-υποστρώματος. Επωάζουμε τα αντιδραστήρια στους 37<sup>0</sup>C για 2 ώρες. Μετρούμε την απορρόφηση σε ELISA plate reader στα 405 nm και διαιρούμε την απορρόφηση με τα mg των συνολικών πρωτεϊνών στο δείγμα έτσι ώστε η ενζυμική δράση να υπολογίζεται ανά mg πρωτεΐνης. Κάθε πείραμα περιελάμβανε αρνητικούς μάρτυρες (κύτταρα χωρίς το εκχύλισμα), μάρτυρες που δεν περιείχαν το κυτταρόλυμα και μάρτυρες χωρίς το υπόστρωμα. Έγιναν 2 πειράματα για την κάθε κασπάση και στο κάθε

πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα για το εκχύλισμα και τους μάρτυρες. Σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε 2 φορές η δράση της αντίστοιχης κασπάσης.

#### **2.2.5. Στατιστική ανάλυση**

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων σε όλες τις μεθόδους υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0).



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

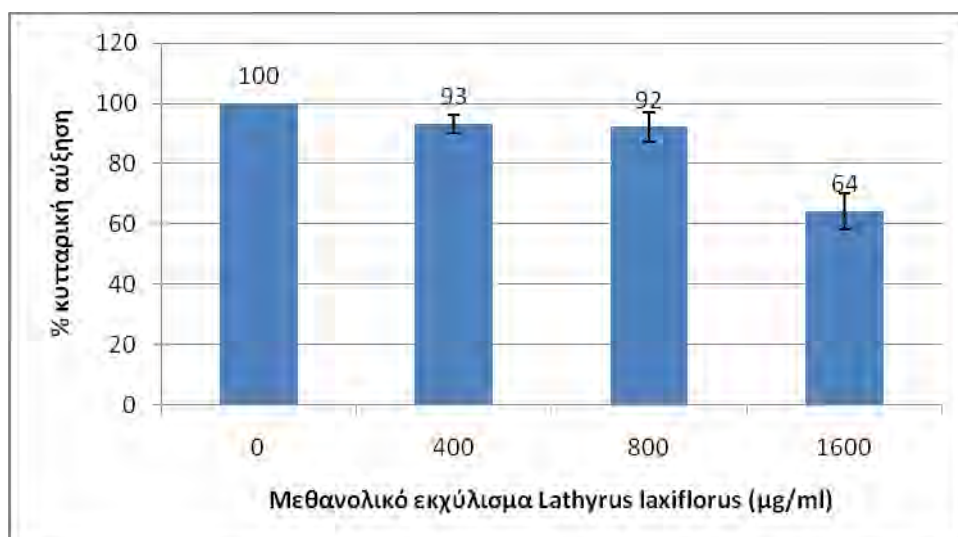
#### 3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΧΤΤ

##### 3.1.1. Εκχυλίσματα *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*.

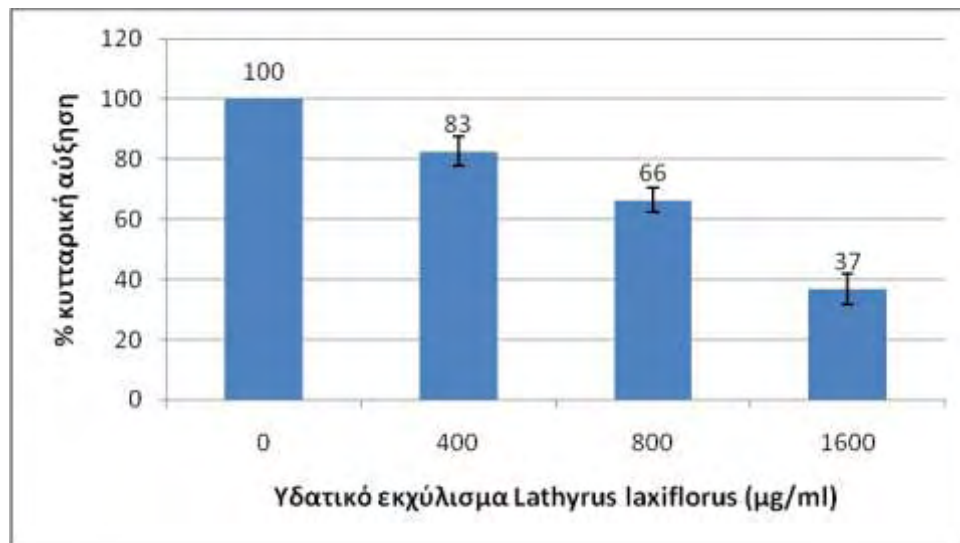
Συνολικά μελετήθηκαν δύο εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus*, ένα μεθανολικό και ένα υδατικό, τα οποία δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 400, 800 και 1600 µg/mL. Και στα δύο εκχυλίσματα παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής αύξησης όταν η συγκέντρωσή τους αυξήθηκε. Στα 1600 µg/mL η κυτταρική αύξηση ήταν η μικρότερη. Ειδικότερα, το υδατικό εκχύλισμα στα 1600 µg/mL έδωσε μικρότερη κυτταρική αύξηση (37%) σε σχέση με το μεθανολικό (64%) στην ίδια συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα γραφήματα 1 και 2.

##### 3.1.2. Πολυφαινολικά καθαρά μόρια του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*.

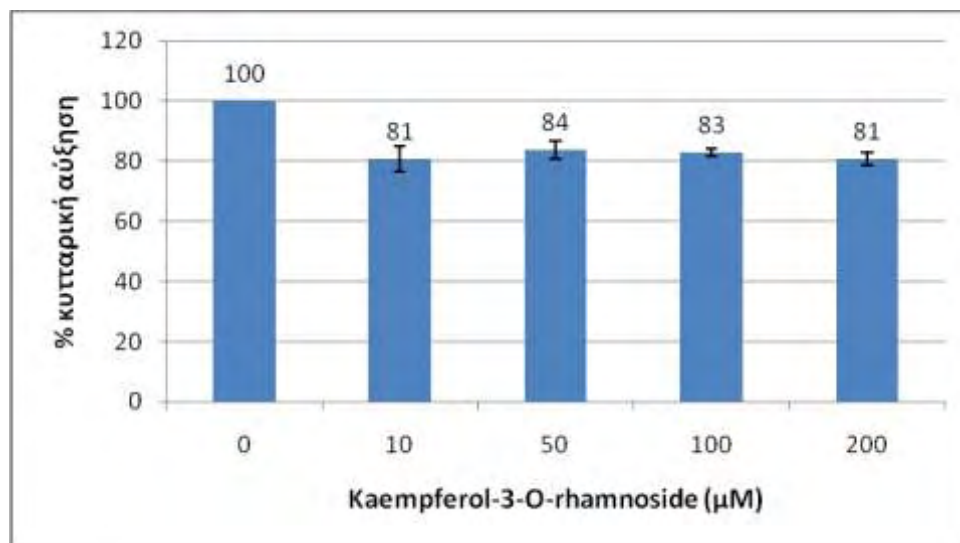
Συνολικά μελετήθηκαν τα παρακάτω έξι πολυφαινολικά μόρια του φυτού *Lathyrus laxiflorus*: Kaempferol – 3 – O – rhamnoside (La.la.W.A), Quercetin – 3 – O – rhamnoside (La.la.W.B), Kaempferol – 3 – O – rutinoside (La.la.W.C), Quercetin – 3 – O – rutinoside (La.la.W.D), Caffeic acid (La.la.W.E), Apigenin – 6 – C – a – L – arabinopyranose – 8 – C – b – D – glucopyranose (La.la.W.H). Τα La.la.W.A, La.la.W.B και La.la.W.E δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200 µM ενώ τα La.la.W.C, La.la.W.D και La.la.W.H δοκιμάστηκαν και σε συγκέντρωση 500 µM. Σε όλα τα μόρια παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής αύξησης στη μεγαλύτερή τους συγκέντρωση πλην του Kaempferol – 3 – O – rutinoside που δεν έδωσε σημαντική μείωση σε καμία συγκέντρωση. Τη μικρότερη κυτταρική αύξηση (35%) έδωσε το Quercetin – 3 – O – rutinoside στη συγκέντρωση 500 µM. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα γραφήματα 3, 4, 5, 6, 7 και 8.



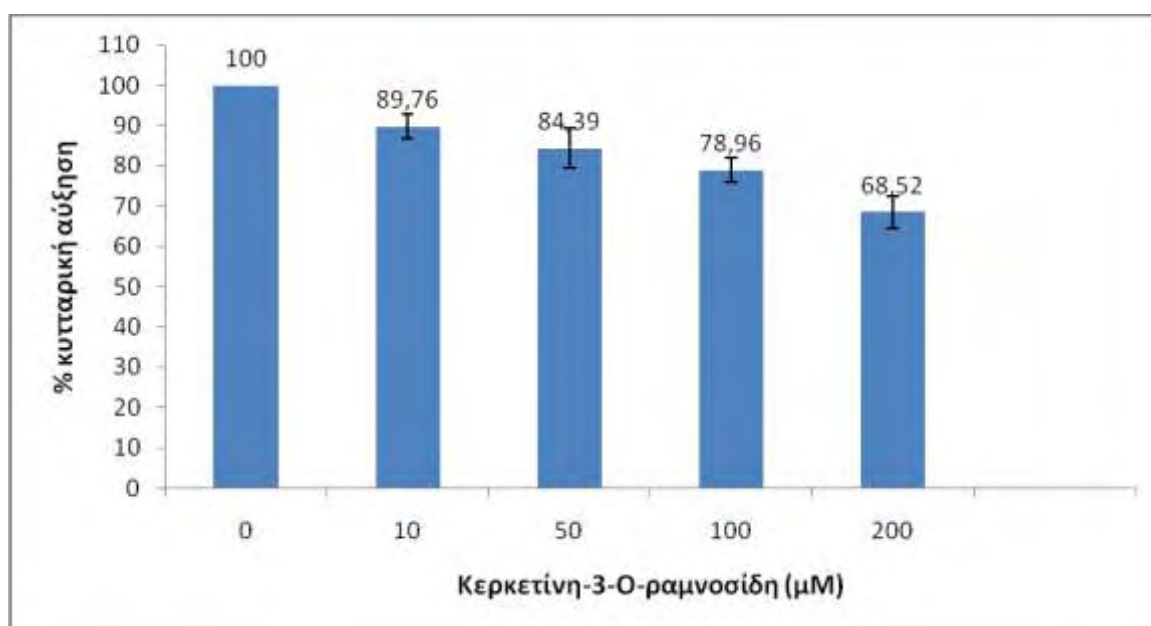
**Γράφημα 1:** Κυτταροτοξική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή +/- το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



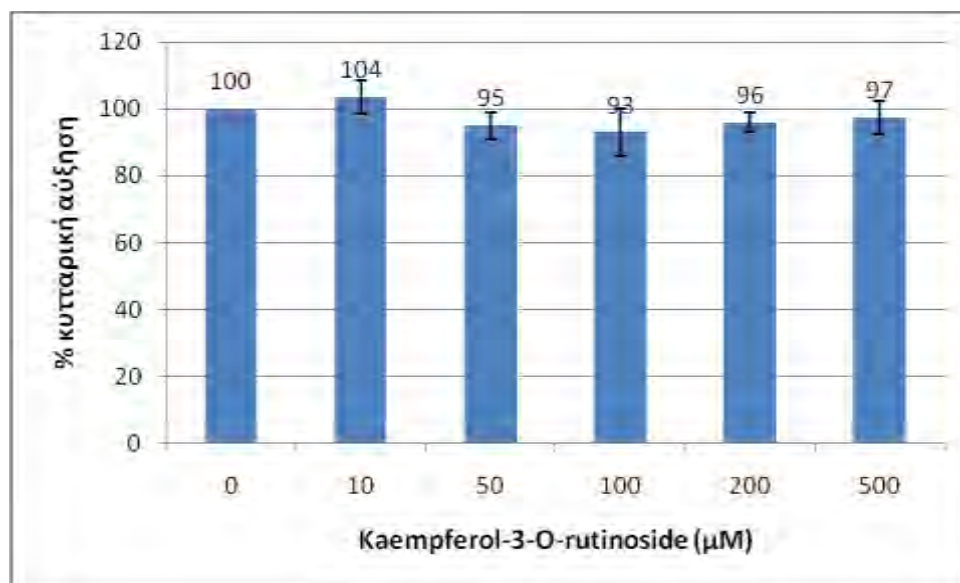
**Γράφημα 2:** Κυτταροτοξική δράση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή +/- το τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



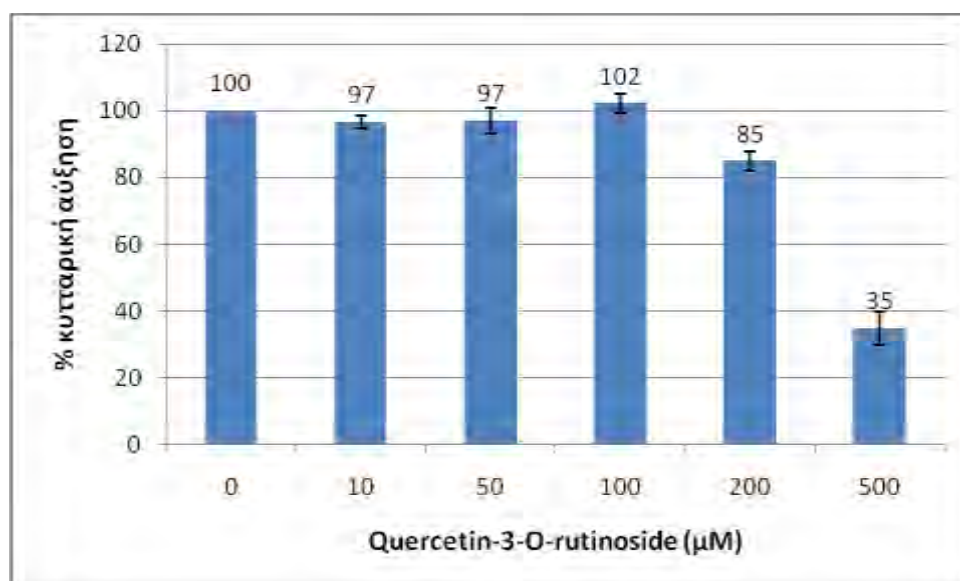
**Γράφημα 3:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Kaempferol – 3 – O – rhamnoside του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.



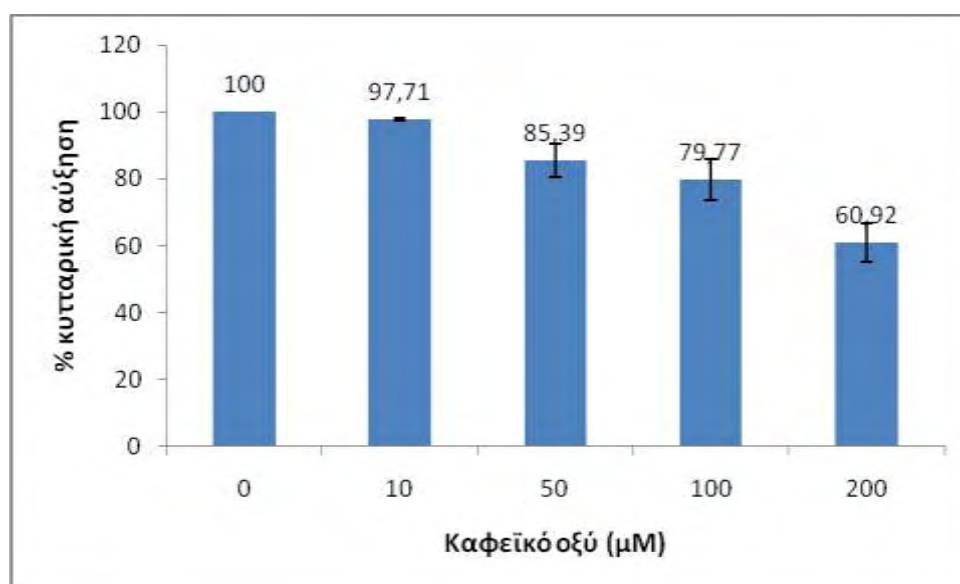
**Γράφημα 4:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Quercetin – 3 –O – rhamnoside του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.



**Γράφημα 5:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Kaempferol – 3 – O – rutinoside του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.

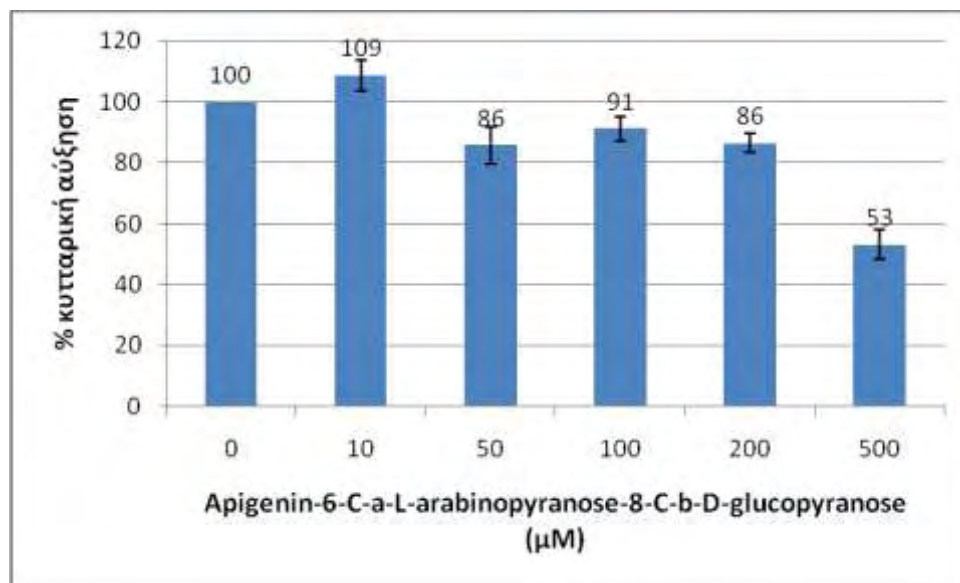


**Γράφημα 6:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Quercetin – 3 – O – rutinoside του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.



**Γράφημα 7:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Caffeic acid του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.

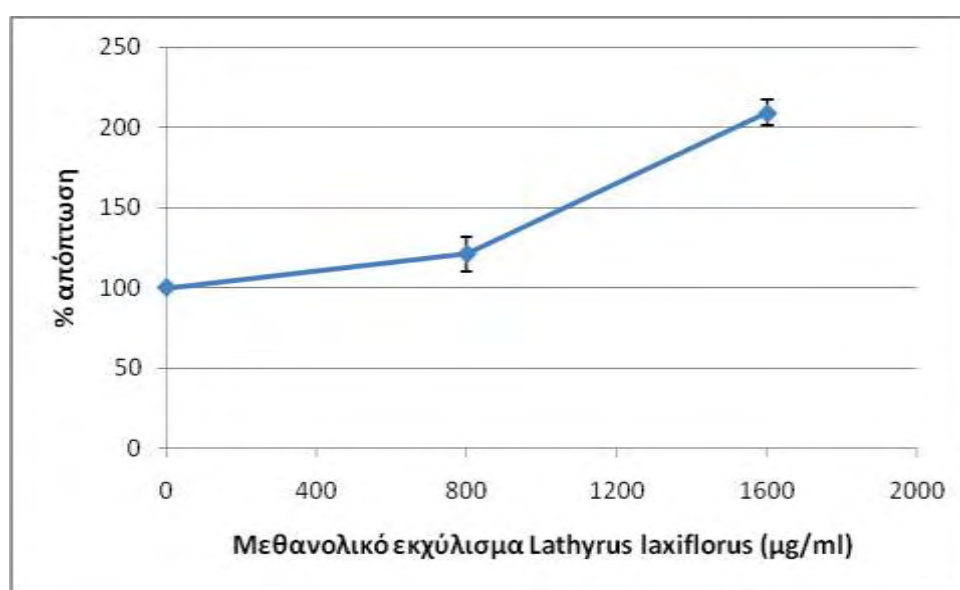




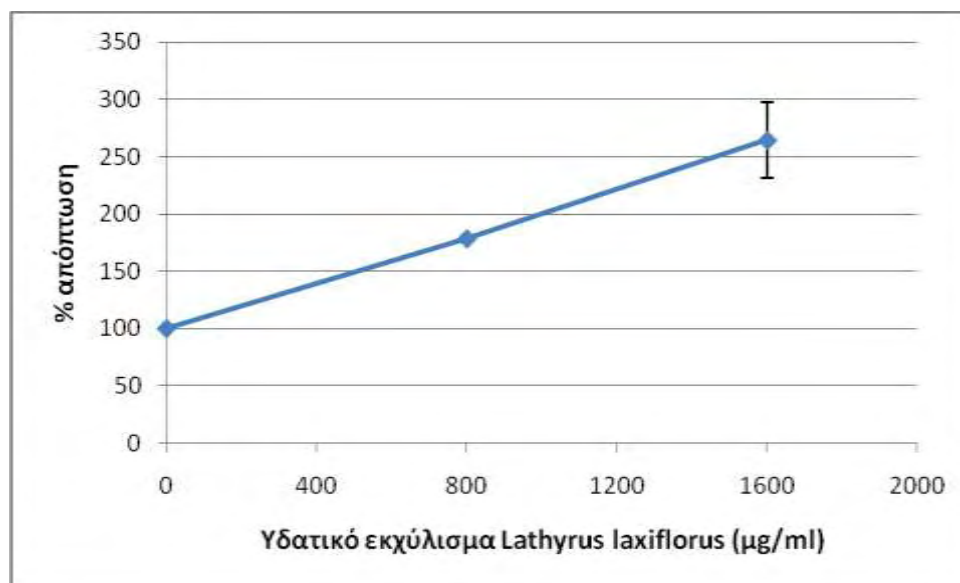
**Γράφημα 8:** Κυτταροτοξική δράση του πολυφαινολικού μορίου Apigenin – 6 – C – a – L – arabinopyranose – 8 – C – b – D – glucopyranose του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.

### 3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ Cell Death Detection ELISA.

Μελετήθηκαν τα δύο εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*, μεθανολικό και υδατικό, τα οποία δοκιμάστηκαν στις συγκεντρώσεις 800 και 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Παρατηρήθηκε απόπτωση και από τα δύο εκχυλίσματα, το υδατικό όμως έδωσε είχε ισχυρότερη δράση προκαλώντας στη συγκέντρωση των 1600  $\mu\text{g/mL}$  αύξηση της απόπτωσης κατά 250% έναντι του μεθανολικού με 200 %. Τα αποτελέσματα δίνονται στα γραφήματα 9 και 10.



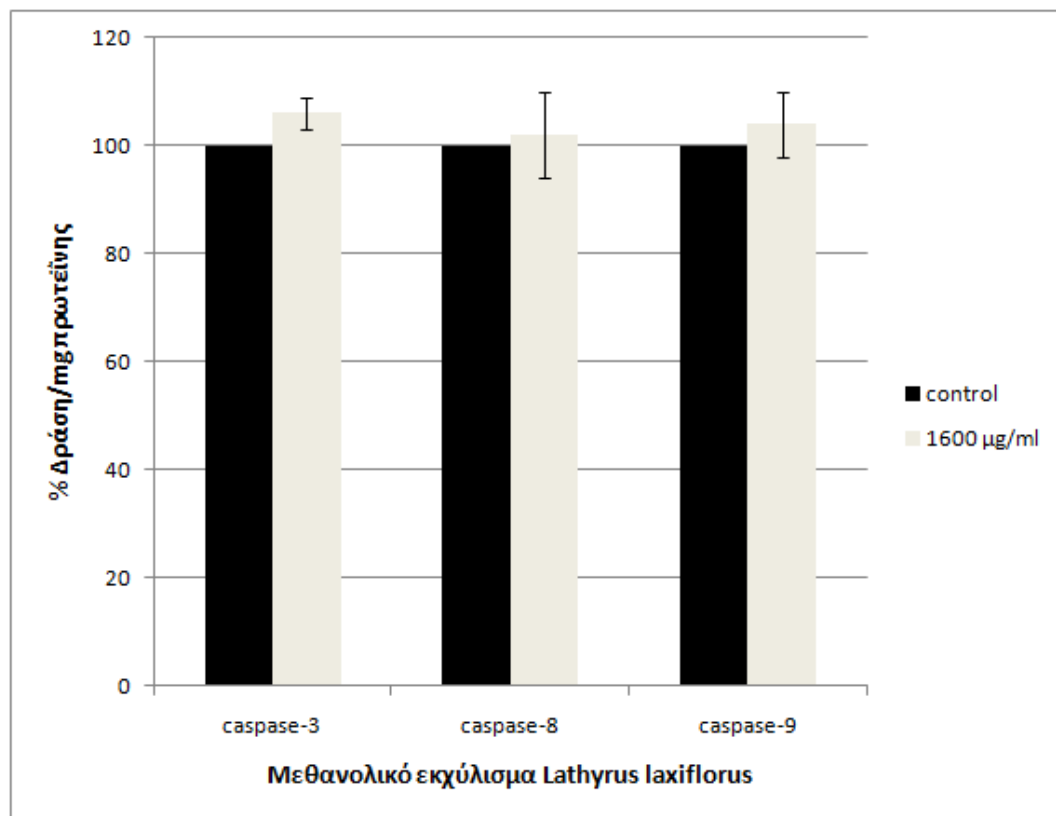
**Γράφημα 9:** Το διάγραμμα δείχνει την % αύξηση στην απόπτωση σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες λόγω της δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.



**Γράφημα 10:** Το διάγραμμα δείχνει την % αύξηση στην απόπτωση σε σύγκριση με τους αρνητικούς μάρτυρες λόγω της δράσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα κύτταρα HepG2.

### **3.3. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ 3, 8 ΚΑΙ 9 ΣΕ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

Μελετήθηκε μόνο το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*, το οποίο δοκιμάστηκε στη συγκέντρωση 1600 µg/mL και επώαστηκε για 24 ώρες με τα κύτταρα. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως το μεθανολικό εκχύλισμα δεν είχε επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2. Τα αποτελέσματα δίνονται στο γράφημα 11.



**Γράφημα 11:** Το διάγραμμα δείχνει την % επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στη δράση των κασπασών 3, 8 και 9 στα κύτταρα HepG2.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος είναι 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. Ο όρος καρκίνος δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ένα από τα πιο σπουδαία επιτεύγματα της βασικής έρευνας για τον καρκίνο είναι η συνειδητοποίηση πως η απόπτωση και τα γονίδια που την ελέγχουν, έχουν σημαντική επίδραση στον κακοήγη φαινότυπο. Η κατανόηση της απόπτωσης έχει εξασφαλίσει τη βάση για νέες στοχευμένες θεραπείες που επάγουν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή τα καθιστούν ευαίσθητα στους καθιερωμένους κυτταροτοξικούς παράγοντες (Μπάμπας Ε., 2009).

Εκτός από τη θεραπεία, η έρευνα για τον καρκίνο εστιάζεται και στην πρόληψη. Η χημειοπροφύλαξη, δηλαδή η πρόσληψη φυτοχημικών συστατικών μέσω της δίαιτας ή με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής με στόχο την προστασία από διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, θεωρείται μια από τις σημαντικότερες σύγχρονες στρατηγικές πρόληψης. Τα τελευταία χρόνια μεγάλος αριθμός ερευνών έχει προσανατολιστεί στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών παραγόντων, οι οποίοι προέρχονται από τρόφιμα της καθημερινής διατροφής (Kellof et al., 2000; Shukla et al., 2004). Περισσότερες από 250 επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών δρουν προστατευτικά στην εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου και άλλων χρόνιων ασθενειών (Surch, 2003).

Οι ιδιότητες αυτές αποδίδονται στις περιεχόμενες σε αυτά βιοδραστικές ενώσεις. Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων και έχουν σημαντικές αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Crozier et al., 2009). Θεωρούνται πολύ σημαντικοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες δρώντας με ποικίλους μηχανισμούς σε όλα τα στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας (Fresco et al., 2006; Manson et al., 2000). Από τις σημαντικότερες χημειοπροστατευτικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι η ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση (Ramos, 2007; Sun et al., 2004). Οι ιδιότητες αυτές έχουν παρατηρηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες (Sun et al., 2004; Galati et al., 2000). Το *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* είναι ένα φυτό με πλούσιο πολυφαινολικό περιεχόμενο (Ranabahu & Haborne, 1993; Kupicha, 1983; Ranabahu, 1992).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων και καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στον

πολλαπλασιασμό και την απόπτωση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ήταν δύο τύπων, υδατικό και μεθανολικό, ενώ οι καθαρές πολυφαινολικές ενώσεις ήταν έξι στο σύνολο και ήταν οι εξής: Kaempferol - 3 - o - rhamnoside (La.la.W.A.), Quercetin - 3 - o - rhamnoside (La.la.W.B.), Kaempferol - 3 - o - rutinoside (La.la.W.C.), Quercetin - 3 - o - rutinoside (La.la.W.D.), Caffeic acid (La.la.W.E.) και Apigenin - 6 - c - a - L – arabinopyranose - 8 - c - b - D – glucopyranose (La.la.W.H.). Χρησιμοποιήθηκαν τρεις in vitro μέθοδοι: α) Χρωματομετρική ανάλυση (XTT) για την ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων, β) προσδιορισμός της επαγωγής της απόπτωσης με τη μέθοδο Cell Death Detection ELISA PLUS και γ) προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των κασπασών 3, 8 και 9 σε αποπτωτικά κύτταρα.

Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αύξηση των κυττάρων HepG2 επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 400, 800 και 1600 µg/mL. Παρατηρήθηκε ότι και τα δύο εκχυλίσματα ήταν κυτταροτοξικά για τα κύτταρα HepG2 σε συγκεντρώσεις > 400 µg/mL και ειδικότερα στη συγκέντρωση 1600 µg/mL παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, το υδατικό εκχύλισμα ήταν πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το μεθανολικό, αφού ανέστειλε κατά 63% την κυτταρική αύξηση, ενώ το μεθανολικό κατά 36%. Σε προηγούμενη μελέτη το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* παρατηρήθηκε ότι είναι κυτταροτοξικό για καρκινικά κύτταρα Hep2 σε συγκεντρώσεις > 100 µg/mL με καλύτερη κυτταροτοξική δράση στη συγκέντρωση 800 µg/mL (Spanou C. et al., 2010). Το γεγονός ότι το υδατικό εκχύλισμα ήταν πιο ισχυρό ίσως να σημαίνει ότι πολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για την αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων. Η κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων στις συγκεντρώσεις αυτές αποδίδεται σε έναν πολύπλοκο μηχανισμό, ο οποίος μπορεί να σχετίζεται με τις αντιοξειδωτικές και προοξειδωτικές ιδιότητες των περιεχόμενων σε αυτά πολυφαινολικών ενώσεων (Yang et al., 2001; Spanou et al., 2007; Spanou et al., 2008; Ramos et al., 2005).

Για τη μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών ενώσεων Kaempferol - 3 - o - rhamnoside (La.la.W.A.), Quercetin - 3 - o - rhamnoside (La.la.W.B.) και Caffeic acid (La.la.W.E.) επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 10, 50, 100 και 200 µM ενώ για τα Kaempferol - 3 - o - rutinoside (La.la.W.C.), Quercetin - 3 - o - rutinoside (La.la.W.D.) και Apigenin - 6 - c - a - L – arabinopyranose - 8 - c - b - D – glucopyranose (La.la.W.H.) επιλέχθηκε επιπλέον και η συγκέντρωση 500 µM. Από τις ενώσεις αυτές το Kaempferol - 3 - o – rhamnoside ανέστειλε στη συγκέντρωση των 10 µM την αύξηση των καρκινικών κυττάρων αλλά σε μικρό ποσοστό (20%). Σε μια άλλη μελέτη, η Kaempferol - 3 - o – rhamnoside δεν ανέστειλε

την αύξηση καρκινικών κυττάρων από το παχύ έντερο, το μαστό, τον πνεύμονα, το κεντρικό νευρικό σύστημα και το στομάχι (Vareek και συν., 2007). Ένα άλλο όμως γλυκοσίδιο της καμπφερόλης που περιείχε τη rhamnoside, η kaempferol 3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1->2)-alpha-L-arabinopyranose) ανέστειλε την αύξηση καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα και του δέρματος (Moon και συν., 2010). Η δεύτερη ένωση που εξετάστηκε και αποτελούσε γλυκοσυλιωμένη μορφή της καμπφερόλης, η Kaempferol - 3 - o - rutinoides, δεν ανέστειλε σε καμία συγκέντρωση την κυτταρική αύξηση (η Kaempferol - 3 - o - rutinoides δεν έχει εξεταστεί σε άλλη μελέτη για αντικαρκινική δράση). Επίσης, άλλες γλυκοσυλιωμένες μορφές της καμπφερόλης έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλουν την αύξηση διάφορων τύπων καρκινικών κυττάρων αλλά όχι των HepG2 (Dimas και συν., 2000). Ωστόσο, η αγλυκονική μορφή της καμπφερόλης έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HCC) ιδιαίτερα σε συνθήκες υποξίας μέσω αναστολής του παράγοντα υποξίας HIF-1 σε συγκεντρώσεις 5-10μM (Mylonis και συν., 2010) αλλά όχι των κυττάρων HepG2 (Bai και συν., 2010). Επιπλέον, η καμπφερόλη έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλει την αύξηση καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα σε συγκέντρωση 50μM προκαλώντας απόπτωση μέσω του παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (AIF) (Jaganathan και Mandal 2009). Από τα δύο γλυκοσυλιωμένα παράγωγα της κερκετίνης, η Quercetin - 3 - o - rhamnoside είχε πιο ισχυρή δράση από τη Quercetin - 3 - o - rutinoides. Η Quercetin - 3 - o - rhamnoside ανέστειλε την κυτταρική αύξηση σε συγκεντρώσεις 100 και 200μM κατά 22% και 32% αντίστοιχα, ενώ η Quercetin - 3 - o - rutinoides μόνο κατά 15% στα 200μM. Δηλαδή, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στα γλυκοσυλιωμένα παράγωγα της καμπφερόλης, φαίνεται πως η προσθήκη rhamnoside στην κερκετίνη προκαλεί πιο ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των HepG2 κυττάρων από ότι η προσθήκη rutinoides. Σε άλλη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας είχε εξεταστεί και η ανασταλτική δράση της κερκετίνης έναντι των HepG2 κυττάρων και είχε βρεθεί ότι αναστέλλει την αύξηση τους σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. κατά 75% σε συγκέντρωση 1μM) (Κερμελιώτου 2011). Άρα, η προσθήκη των συγκεκριμένων γλυκοσιδίων, της rhamnoside και της rutinoides, ελαττώνει την αναστολή που ασκεί η κερκετίνη στην αύξηση των HepG2 κυττάρων όπως είχε παρατηρηθεί και σε άλλα καρκινικά κύτταρα (Browning και συν., 2005). Επίσης, από τις εξεταζόμενες πολυφαινόλες το caffeic acid ανέστειλε την αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 κατά 21% και 40% σε συγκεντρώσεις 100 και 200μM αντίστοιχα όπως έχει δείχτεί και σε άλλες μελέτες (Chung και συν., 2004). Τέλος, η Apigenin - 6 - c - a - L - arabinopyranose - 8 - c - b - D - glucopyranose ήταν δραστική στις συγκεντρώσεις των 200 μM και 500μM παρουσιάζοντας αναστολή της κυτταρικής αύξησης κατά 14%, και 47% αντίστοιχα. Μελέτες έχουν δείξει ότι



η απιγενίνη αναστέλλει σημαντικά την αύξηση των HepG2 κυττάρων (Choi και συν., 2007). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπως και άλλων μελετών δείχνουν ότι η γλυκοσυλίωση της απιγενίνης ελαττώνει την αντικαρκινική της δράση (Srivastava και Gupta 2009).

Προκειμένου να διαπιστωθεί ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την αύξηση των HepG2, εξετάστηκε η επαγωγή της απόπτωσης. Τα δύο εκχυλίσματα, υδατικό και μεθανολικό, του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* παρουσίασαν σημαντική αύξηση της απόπτωσης στη συγκέντρωση 1600 µg/mL. Το υδατικό εκχύλισμα όμως έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στη συγκέντρωση 1600 µg/mL με 250 % απόπτωση έναντι του μεθανολικού με 200 %. Στη συνέχεια, εξετάστηκε αν η επαγωγή της απόπτωσης οφείλεται σε αύξηση της δράσης των κασπασών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα δεν προκάλεσε αύξησης της πρωτεολυτικής δράσης των κασπασών μετά από 24 ώρες επώαση με τα κύτταρα. Θα πρέπει να γίνει επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα και σε λιγότερες από 24 ώρες γιατί μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των κασπασών συμβαίνει σε μικρότερο χρονικό διάστημα από την παρατηρούμενη απόπτωση. Επίσης, η μη επαγωγή στη δράση των κασπασών μπορεί να οφείλεται στο ότι άλλες πρωτεΐνες ενεργοποιούνται για να προκαλέσουν επαγωγή της απόπτωσης όπως ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης AIF.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που δείχνει ότι εκχυλίσματα από το *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* μπορούν να αναστείλουν την κυτταρική αύξηση καρκινικών ηπατοκυττάρων. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται εν μέρει στις περιεχόμενες πολυφαινόλες όπως η Quercetin - 3 - o - rhamnoside, η Kaempferol - 3 - o - rhamnoside και το καφεϊκό οξύ. Κατά συνέπεια, η κυτταροτοξική δράση των εκχυλισμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* στα καρκινικά κύτταρα HepG2, το καθιστά πηγή χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα των εκχυλισμάτων να προκαλούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υποδεικνύει έναν ακόμη μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης του και καθιστά τα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά του ως πιθανούς χημειοπροστατευτικούς παράγοντες. Περαιτέρω έρευνες σε μοριακό επίπεδο απαιτούνται για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας και απόπτωσης των εκχυλισμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών μορίων του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*. Επίσης, απαιτείται μελέτη της δράσης τους και σε άλλες καρκινικές σειρές, καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baer-Dubowska W., Bartoszek A., Malejka-Ginanti D. Carcinogenic and anticarcinogenic food components. Taylor & Francis Group, **2006**.
- Benchimol S. p53 - dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ* 8: 1049 - 1051, **2001**.
- Bode AM, Dong Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.*, 45:422–430, 2006.
- Broker LE, Krzyt FA & Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 11: 3155 - 3162, **2005**.
- Chang H., and Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol. Molec. Biol. Reviews*, 64, 821-846, **2000**.
- Crozier A., Clifford M.N., Ashihara J. Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing, **2006**
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.B. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Reports*, 26: 1001-1043, **2009**.
- Dang C. c - Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 1 - 11, **1999**.
- De Flora S., Ferguson L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut Res*, 591: 8-15, **2005**.
- Dekker M. Phytochemicals in health and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 12: 2082, **2004**.
- Donepudi M and Grütter M. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, 101-102, 145-153, **2002**.
- Fadeel B. & Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide - ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258: 479 - 517, **2005**.
- Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M.P.M. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*, 26:747-66, **2006**.
- Galati G., Teng S., Moridani M.Y., Chan T.S., O'Brien P.J. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metab Drug Interact*, 17:311-349, **2000**.
- Ghobrial I., Witzig T. & Adjei A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55: 178 - 194, **2005**.
- Grütter M. Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 649-655, **2000**.

- Harborne J. B. Distribution of flavonoids in the Leguminosae. *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (Harborne J. B., Boulter D. & Turner B. L., eds), pp. 257 - 282, Academic Press, London, **1971**.
- Harborne J. B. Characterisation of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolysis. *Phytochemistry* 4, 107 - 120, **1965**.
- Harborne J. B., Boulter D. & Turner B. L. Chemotaxonomy of the Leguminosae, *Academic Press, London*, **1971**.
- Hoffman B., Amanullah A., Shafarenko M. & Lie - bermann DA. The proto - oncogene c - myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*, 21: 3414 - 3421, **2002**.
- Hong W.K., Sporn M.B. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278: 1073-1077, **1997**.
- Hooker J. T. Εισαγωγή στη Γραμμική Β, έκδοση Εθνικής Τράπεζας, **1994**.
- Kataoka T., Budd RC, Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., et al. The caspase 8 inhibitor Flip promotes activation of NF - kB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10: 640 - 648, **2000**.
- Kelloff G.J., Crowell J.A., Cteele V.E., Lubet R.A., Malone W.A., Boone C.W., et.al. Progress in cancer chemoprevention agents: Development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr*, 130: S467-471, **2000**.
- Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention. *Vol e. Humana Press*, **2005**.
- Kenneth D. R., Setchell & Aedin Cassidy. Dietary Isoflavones: Biological effects and Relevance to Human Health. *Clinical Mass Spectrometry, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229 and School of J. Nutr.* 129: 758S – 767S, **1999**.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*, **2007**.
- Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer PH & KirchhoffS. Cellular FLICE - inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase - 8 activation at the CD95 death - inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276: 20633 - 20640, **2001**.
- Krauss G., Biochemistry of Signal transduction and Regulation, *Chapter 15: Apoptosis, Wiley Editions*, **2002**.
- Kupicha F. K. The onfrageneric structure of Lathyrus. *Notes Roy. Bot. Gdn. Edinburgh* 41, 209 - 244, **1983**.

- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 203(2):124–131, **2005**.
- Lowe S. & Lin A. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485 - 495, **2000**.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 727 - 47, **2004**.
- Manach C., Mazur A., Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol*, 16: 77-84, **2005**.
- Manson M.M., Gescher A., Hudson E.A., Plummer S.M., Squires M.S., Prigent S.A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol Letters*, 112-113: 499-505, **2000**.
- Marrero JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*, 22:248-253, **2006**.
- Massimo D'Archivio, Carmela Santangelo, Beatrice Scazzocchio, Rozaria Vari, Carmela Filesi, Roberta Masella & Claudio Giovannini. Modulatory Effects of Polyphenols on Apoptosis Induction: Relevance for Cancer Prevention. *Int J Mol Sci*, 9, 213 - 228, **2008**.
- Okuda, K. Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 32(Suppl. 1):225-237, **2000**.
- Pecket F. C. The constituents of leaf extracts in the genus *Lathyrus* and their bearings on taxonomy. *New Phytologist*, 58, 182 - 187, **1959**.
- Pisum sativum* (‘Φάβα της Αμοργού’): Αξιόλογη πηγή βιοδραστικών φυσικών προϊόντων. Δρ. Αληγιάννης Νεκτάριος, **2009**.
- Porter AG., Janicke RU. Emerging roles of caspase 3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 99 – 104, **1999**.
- Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, 18: 427-442, **2007**.
- Ranabahu P. Occurrence of flavonoids in the genus *Lathyrus*, a chemosystematic survey. *M. Phil. Thesis, Univ. Reading*, **1992**.
- Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*, 99: 1-13, **2003**.
- Reynaud J., Ismaili A. & Jay M. Flavonoid glycosides of *Lathyrus pratensis*. *Phytochemistry* 20, 2052, **1981**.
- Robbins & Cotran. Pathology Basis of Disease. 7th ed, Elsevier, New York 26 - 32, **2003**.
- Sellers W. & Fisher D. Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest* 104: 1655 - 1661, **1999**.

- Selvendiran K, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, Yano H, Kojiro M, Sata M. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res.*, 66(9):4826–4834, **2006**.
- Shereiql I., Reddy P., Brenner D.E. Chemoprevention: general perspective. *Crit Rev Oncol Hem*, 33: 157-167, **2000**.
- Shukla Y., Kumar Pal.S. Dietary cancer chemoprevention: An overview. *Inter J Jum Gen*, 4: 265-276, **2004**.
- Smith J.J., Tully P., Padberg R.M. Chemoprevention: A primary cancer preception strategy. *Sem Oncol Nurs*, 21: 243-251, **2005**.
- Song Z., and Steller H. Death by desing: mechanism and control of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 9, M49-52, **1999**.
- Spanou C, Aliqiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D: Effect of Leguminosae family plant extracts and polyphenolic fractions on topoisomerase I - induced nicking of DNA. *Rev Clin Pharmacol Pharmacokinet*, 22: 336 - 338, **2008**.
- Spanou C, Bourou G, Dervishi A, Aliqiannis N, Angelis A, Komiotis D, Skaltsounis AL, Kouretas D: Antioxidant and chemopreventive properties of polyphenolic compounds derived from Greek legume extracts. *J Agric Food Chem*, 56: 6967 - 6976, **2008**.
- Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aliqiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D: Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Res*, 27: 3403 - 3410, **2007**.
- Spanou C., Stagos D., Aliqiannis N. & Kouretas D. Influence of Potent Antioxidant Leguminosae Family Plant Extracts on Growth and Antioxidant Defense System of Hep2 Cancer Cell Line. *J Med Food*, 13 (1) 149 - 155, **2010**.
- Spanou C., Stagos D., Tousias L. Angelis A., Aliqiannis N., Skaltsounis A. L. & Kouretas D. Assessment of Antioxidant Activity of Extracts from Unique Greek Varieties of Leguminosae Plants Using In vitro Assays. *Anticancer Research*, 27: 3403 - -3410, **2007**.
- Sun S.Y., Hail N., Lotan R. Apoptosis as a novel target of cancer chemoprevention. *J Nat Cancer Inst*, 69: 662-669, **2004**.
- Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3:768–80, **2003**.
- Trosko JE. Dietary modulation of the multistage, multimechanisms of human carcinogenesis: effects on initiated stem cells and cell-cell communication. *Nutr Cancer*, **2006**.
- Vermeulen K., Van Bockstaele DR & Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84: 627 - 639, **2005**.

- Voutsadakis I. Apoptosis and Pathogenesis of lymphoma. *Acta Oncologica* 39: 151 - 156, **2000**.
- Wallace - Brodeur RR & Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 55: 64 - 75, **1999**.
- Watson W, Cai J, Jones D. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr.*,20:485–505, **2000**.
- Watson RW & Fitzpatrick JM. Targeting apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int* 96 (Suppl 2): 30 - 34, **2005**.
- Yang C.S., Laundau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 21: 381-406, **2001**.
- Yuspa, S.H., Poirier, M.C. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv. Cancer Res.*, 50:25-68, **1988**.
- Κουλούκουσα Μ., Χαβάκη Σ., Κίττας Χ. και Μαρίνος Ε. Ο ρόλος της πρωτεϊνικής κινάσης C στον καρκίνο του μαστού. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής* 17: 55 - 66, **2003**.
- Νακοπούλου Α. και Μιχαλοπούλου Α. Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*, 11: 6 - 14, **1997**.
- Στάγκος Δημήτριος. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων σε εκχυλίσματα και φυτικές πολυφαινόλες από ελληνικές ποικιλίες Αμπέλου (*Vitis Vinifera*), **2006**.
- Μπάμπας Ευάγγελος. Δραστικότητα κασπασών σε προκαρκινικές και καρκινικές καταστάσεις τραχήλου μήτρας του ανθρώπου, **2009**.
- Σπανού Χρυσούλα. Μελέτη βιολογικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες ψυχανθών, **2010**.

