



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



## **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ**

# **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΥ ΕΜΙΛΥ**  
**ΛΑΡΙΣΑ -2017**

# **ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΕ ΔΥΝΗΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

**ΕΜΙΛΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΥ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

***ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ***

# **TRITERPENES WITH CYTOTOXIC ACTION AS POTENTIAL DRUGS.**

**ΕΜΙΛΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΥ**

**ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

***ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ***

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT: .....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	8
1.1 ΓΕΝΙΚΑ .....	8
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ-ΤΟ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ .....	10
1.2.1 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων: .....	11
1.3 ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ .....	15
1.3.1 Ήπαρ:.....	15
1.3.2 Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα : .....	15
2.ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ .....	20
2.1. ΓΕΝΙΚΑ .....	20
2.2 ΤΕΡΠΕΝΙΑ – ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ .....	21
2.2.1 Τερπένια .....	21
2.2.2 Βιοσύνθεση Τερπενοειδών .....	22
2.3 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ:.....	24
2.3.1 Γενικά: .....	24
2.3.2. Βιολογικές Δράσεις Τριτερπενίων: .....	26
2.3.3 Βιολογικές Δράσεις Ολεανολικού Οξέος: .....	27
2.3.4. Βιολογικές Δράσεις Σελαστρούλης: .....	28
2.3.5. Βιολογικές Δράσεις Αλυσόλης Β: .....	30
ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	32
Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
1.ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ: .....	33
2.ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ: .....	34
3.ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2: .....	35
4.ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ .....	36
5.ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HepG2 .....	36

6.ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΚΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	38
6.1 Πάγωμα Κυττάρων : .....	38
6.2 Απόψυξη – Ξεπάγωμα κύτταρων : .....	38
7.ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ: .....	39
8.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΧΤΤ: .....	41
Α) Αρχή της μεθόδου : .....	41
Β) Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο ΧΤΤ .....	42
Β1. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	43
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ: .....	44
Μελέτη της επίδρασης τριτερπενικών ενώσεων στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων : ....	44
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ: .....	50

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ**

Πίνακας 1: Τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα: .....	14
Πίνακας 2: Ταξινόμηση Τερπενοειδών .....	21
Πίνακας 3: Παραδείγματα νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών ευαίσθητων σε κυτταροτοξικές ιδιότητες τριτερπενίων (12).....	25
Πίνακας 4: Τιμές όγκου για φλάσκες T25 και T75.....	37

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ**

Εικόνα 1: Πορεία καρκινογένεσης .....	11
Εικόνα 2: Τρόπος ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων.....	12
Εικόνα 3: Αγγειογένεση σε όγκο .....	13
Εικόνα 4: Μετάσταση όγκων .....	13
Εικόνα 5: Ανατομία ανθρώπινου ήπατος.....	15
Εικόνα 6: Μικροσκοπική απεικόνιση HCC .....	18
Εικόνα 7: Βιοσύνθεση Τερπενοειδών .....	23
Εικόνα 8: HepG2 κύτταρα .....	35
Εικόνα 9: Αιμοκυτταρόμετρο .....	40
Εικόνα 10: Προσθήκη εναιωρήματος κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο .....	40
Εικόνα 11: Μέτρηση αριθμού κύτταρων με το αιμοκυτταρόμετρο .....	41
Εικόνα 12: Αναγωγή αντιδραστηρίου ΧΤΤ σε έγχρωμο προϊόν φορμαζάνη.....	42

Εικόνα 13: Δομή ολεανολικού οξέος.....	44
Εικόνα 14: Δομή παραγώγου#1 ολεανολικού οξέος .....	44
Εικόνα 15: Δομή παραγώγου#2 ολεανολικού οξέος .....	45
Εικόνα 16: Δομή παραγώγου#3 ολεανολικού οξέος .....	45
Εικόνα 17: Δομή σελαστρόλης .....	46
Εικόνα 18: Δομή αλυσόλης Β .....	47

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ**

Γράφημα 1: Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από το ολεανολικό οξύ και τα παράγωγά του, σε συγκέντρωση 25μΜ. ....	45
Γράφημα 2: Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης σελαστρόλης.....	47
Γράφημα 3: Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από διαφορετικές συγκεντρώσεις της αλυσόλης Β. ....	48
Γράφημα 4: Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από τις ενώσεις που εξετάστηκαν. ....	48

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπενοειδή είναι μια πολύ υποσχόμενη κατηγορία φυσικών ενώσεων που απομονώνονται από διάφορα είδη φυτών και χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον σε παραδοσιακές ιατρικές όπως είναι η Κινέζικη και η Ασιατική. Τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές μελέτες εστιάζονται στις διάφορες βιολογικές δράσεις των τριτερπενικών ενώσεων, με ιδιαίτερη έμφαση στην ικανότητα τους να αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό και να επάγουν την απόπτωση σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Οι μελέτες αυτές επικεντρώνονται στην δυνητική χρήση των τριτερπενίων ως αντικαρκινικά φάρμακα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση τριτερπενικών ενώσεων σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2. Αξιολογήθηκε η επίδραση της σελαστρόλης, της αλισόλης B, καθώς και του ολεανολικού οξέος και επιλεγμένων συνθετικών παραγώγων του στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Τα κύτταρα επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων και το εκατοστιαίο ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις σελαστρόλη και αλισόλη B δρουν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και αναστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 στη συγκέντρωση των 25μΜ. Στην ίδια συγκέντρωση το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει μικρή κυτταροτοξικότητα, ενώ οι τροποποιήσεις στη δομή του δεν βελτιώνουν την δραστικότητα των παραγώγων σε σχέση με τη μητρική ένωση. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με την ήδη καθιερωμένη αντικαρκινική δράση των τριτερπενικών ενώσεων.

## **ABSTRACT:**

Triterpenoids is a very promising class of natural compounds isolated by various plant species. They are mainly used in traditional medicine, such as Chinese and Asian. In the last years many research focused on the various biological activities of triterpenoids, especially in their ability to inhibit proliferation and induce apoptosis in different cancer cells lines. These studies investigate the potential use of triterpenes as anticancer drugs. In the present study we investigated the effects of triterpenoids compounds in human cancer cell line of human hepatocellular carcinoma HepG2. The examined compounds included celastrol, alisol B and oleanolic acid, as well as three selected synthetic derivatives of oleanolic acid. HepG2 cells were incubated with different compound concentrations and the % inhibition of cellular proliferation compared to control cells was determined by the XTT method. Our results demonstrate that celastrol and alisol B inhibit cellular growth in a dose dependent manner, and exhibit high cytotoxicity at the concentration of 25  $\mu$ M. At the same concentration oleanolic acid showed low cytotoxicity, while the structural modifications introduced in the examined derivatives do not improve the activity of the compounds compared to the parent compound. The results of this study are in agreement with the already established anticancer properties of triterpenoid compounds

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

#### **1.1 ΓΕΝΙΚΑ**

Ο καρκίνος είναι ίσως το σοβαρότερο πρόβλημα υγείας που παρατηρείται στις μέρες μας. Μπορεί να προσβάλλει κάθε άνθρωπο ανεξαρτήτως φύλου, ηλικίας, χρώματος και εθνικότητας. Με βάση επιδημιολογικά στοιχεία θεωρείται η δεύτερη πιο σημαντική αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιοπάθειες (1). Καρκίνοι θεωρούνται όλες οι κακοήθεις νεοπλασίες. Η ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να ξεκινήσει σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος. Σε αυτή την ιδιαίτερη και απρόβλεπτη πλέον ασθένεια, τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται κανονικά και όπως πρέπει στα διάφορα σήματα έλεγχου, δεν συμπεριφέρονται όπως τα φυσιολογικά, αναπτύσσονται και διαιρούνται με το δικό τους αυτόνομο και ανεξέλεγκτο τρόπο, έχοντας ταυτόχρονα και την ικανότητα να διεισδύσουν σε γειτονικούς ιστούς αλλά και να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα σημεία, καθώς εκμεταλλεύονται την κυκλοφορία του αίματος για να δημιουργήσουν καινούργιες εστίες κακοήθειας και να εξαπλωθούν σε όλο το σώμα (1).

Η γενικευμένη απώλεια του έλεγχου της ανάπτυξης των κυττάρων είναι αποτέλεσμα συσσωρευμένων ανωμαλιών σε πολλά ρυθμιστικά συστήματα πολλών κυττάρων (1). Κανονικά τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται για να δώσουν καινούργια κύτταρα, ενώ όταν γεράσουν ή καταστραφούν υπόκεινται στο φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο, την απόπτωση. Στην περίπτωση του καρκίνου τα κύτταρα παύουν να υπακούουν σε αυτή τη τακτική διαδικασία, διαιρούνται με ανεξέλεγκτο ρυθμό χωρίς το σώμα όμως να χρειάζεται καινούργια κύτταρα και τα κατεστραμμένα ή γερασμένα κύτταρα που φυσιολογικά θα έπρεπε να υπόκεινται σε απόπτωση συνεχίζουν να ζουν.

Οι καρκινικοί όγκοι είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης πολλών κυττάρων σε ένα ιστό ή όργανο λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους. Κύριο χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι ότι έχουν την ικανότητα να διεισδύουν σε γειτονικούς ιστούς και να μεταφέρονται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος δημιουργώντας νέους όγκους (33).

Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων που περιλαμβάνει γενετική αλλοίωση σε γονίδια. Αποτέλεσμα αυτής της γενετικής αλλοίωσης είναι ο διαρκής πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η μετατροπή τους από φυσιολογικά σε καρκινικά κύτταρα (33).

Η όλη διαδικασία της καρκινογένεσης προϋποθέτει βλάβη στο γενετικό υλικό για την οποία ευθύνονται διάφοροι καρκινικοί παράγοντες. Οι καρκινικοί παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία είναι οι καθοριστικοί καρκινικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα διάφορες χημικές ουσίες, ενώ στην δεύτερη κατηγορία εντάσσονται οι κληρονομικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα η μεταβίβαση από γονείς ενός παθολογικού γονιδίου στο παιδί τους και στην τρίτη κατηγορία είναι οι παράγοντες κίνδυνου με περιστασιακή ή συστηματική εμφάνιση όπως είναι το φύλο, η ηλικία και το



περιβάλλον. Με τη πάροδο του χρόνου και τις επαναλαμβανόμενες μελέτες έχει προσδιοριστεί ένας εντυπωσιακός αριθμός παραγόντων που προκαλούν καρκίνο. Τέτοιοι παράγοντες είναι :

1.Χημικές καρκινογόνες ουσίες: Είναι ενώσεις με πληθώρα χημικών δομών και μπορεί να είναι φυσικές ή συνθετικές, επιπλέον μπορεί να είναι ανόργανες ή οργανικές ή και μεικτές ακόμη (καπνός και τρόφιμα). Στις περισσότερες περιπτώσεις ενεργοποιούνται μέσω μεταβολικής μετατροπής, άρα έχουν έμμεση δράση και ονομάζονται προκαρκινικές ενώσεις. Υπάρχουν και ενώσεις με άμεση δράση των οποίων η δομή τους επιτρέπει να προκαλέσουν καρκίνο χωρίς προηγούμενη μεταβολική ενεργοποίηση στον οργανισμό. Τέλος υπάρχει μία ακόμα κατηγορία χημικών καρκινογόνων ενώσεων οι συν-καρκινογόνες οι οποίες δεν προκαλούν καρκίνο από μόνες τους αλλά ενισχύουν την επίδραση άλλων (35).

2.Η επίδραση της ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Η ακτινοβολία μπορεί να είναι υπεριώδης, ηλιακή, ακτίνες χ, από πυρηνική αντίδραση και ραδιοϊσότοπα. Για παράδειγμα η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου του δέρματος. Η έκταση της επίδρασης της ακτινοβολίας εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης σε αυτές. Η κύρια επίπτωση τους είναι ότι επιδρούν στο πυρήνα, στο DNA με μεταλλάξεις, ρήξεις, και διαγραφές με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να είναι φορείς μίας μετάλλαξης (35).

3. Μια ξεχωριστή ομάδα παραγόντων κίνδυνου για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι οι ιοί. Υπάρχουν DNA ιοί και RNA ιοί που μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό κυττάρων ή ακόμα και αλλαγή σε δομικά χαρακτηριστικά και μορφολογικές ιδιότητες των κυττάρων. Ένας γνωστός DNA ιός είναι αυτός της ηπατίτιδας Β που οδηγεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και ένας RNA ιός είναι ο ρετροϊός HTLV III που προκαλεί το σάρκωμα Kaposi (35).

Υπάρχουν περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου οι οποίοι διαφέρουν στη συμπεριφορά αλλά και τη θεραπεία και ταξινομούνται ανάλογα με το τύπο των κυττάρων από τα οποία προέρχονται αλλά και από το όργανο ή τον ιστό στα οποία αναπτύσσονται. Οι περισσότεροι καρκίνοι εμπίπτουν στις κατηγορίες καρκίνωμα, σάρκωμα και λευχαιμίες ή λέμφωμα. Το καρκίνωμα είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου και σχηματίζεται από επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα δηλαδή που καλύπτουν τα τοιχώματα των οργάνων. Αποτελεί το 90% του συνολικού αριθμού των καρκίνων. Η ονομασία των καρκινωμάτων γίνεται με βάση το είδος των επιθηλιακών κυττάρων. Το αδενοκαρκίνωμα για παράδειγμα σχηματίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα τα οποία παράγουν βλέννα και υγρά, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται στην κατώτερη ή βασική στοιβάδα της επιδερμίδας. Το σάρκωμα είναι η εμφάνιση συμπαγών όγκων σε μύες, χόνδρους και ινώδη ιστό (π.χ. τένοντες και συνδέσμους). Ο πιο κοινός τύπος σαρκώματος μαλακών ιστών είναι το σάρκωμα Kaposi. Τέλος οι λευχαιμίες είναι μία ευρέως γνωστή κατηγορία καρκίνων που αντιστοιχεί στο 8% του συνολικού αριθμού καρκίνων. Σχηματίζεται από κύτταρα του αίματος και του ανοσοποιητικού συστήματος. Ουσιαστικά μεγάλος αριθμός μη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων συσσωρεύονται σε αίμα και μυελό των οστών. Η μείωση των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος κάνει δύσκολη την πρόσβαση σε οξυγόνο, τον έλεγχο των αιμορραγιών και τη καταπολέμηση λοιμώξεων (1,33).

## 1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ-ΤΟ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η εμφάνιση κακοήθους μορφώματος σε συγκεκριμένο ιστό ή όργανο του σώματος είναι απόρροια της διαταραχής των ρυθμιστικών μηχανισμών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του φυσιολογικού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης. Η ύπαρξη ισορροπίας και φυσιολογικής λειτουργίας είναι αποτέλεσμα της δράσης ρυθμιστικών μορίων, προϊόντων έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που αναστέλλουν τη διαδικασία διαίρεσης των κυττάρων. Όταν δημιουργείται όγκος σημαίνει πως είτε γίνεται ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός είτε δεν γίνεται απόπτωση κυττάρων ή υπάρχει συνδυασμός και των δυο αυτών γεγονότων. Τα γεγονότα αυτά είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης μεταλλάξεων στα γονίδια των εμπλεκόμενων ρυθμιστικών μορίων. Λόγω της μετάλλαξης αυτής τα ρυθμιστικά μόρια αλλοιώνονται και ως εκ τούτου τα κύτταρα ανεξαρτητοποιούνται και δεν υπακούνε στα σήματα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιάζονται αδιάκοπα. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι σημειακές, επεκτάσεις, μεταθέσεις, απαλοιφές ή παρεμβολές και είναι τέτοιες που ενεργοποιούν τα πρωτοογκογονίδια και απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το μεταλλαγμένο κύτταρο γίνεται καρκινικό πολλαπλασιάζεται και διεισδύει σε γειτονικούς ιστούς. Η περαιτέρω διατήρηση της καρκινικής μάζας γίνεται με την αγγειογένεση που προσφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα καρκινικά κύτταρα.

Ουσιαστικά οι καρκίνοι προκύπτουν από μία διαδικασία στην οποία δημιουργείται ένας αρχικός πληθυσμός ελαφρώς παθολογικών κυττάρων, απόγονοι ενός μοναδικού προγονικού μεταλλαγμένου κύτταρου. Σε κάθε στάδιο, ένα κύτταρο αποκτά μία πρόσθετη μετάλλαξη που του δίνει ένα εκλεκτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα γειτονικά του, που το καθιστά πιο ικανό να αναπτυχθεί σε έναν όγκο μέσα στο περιβάλλον του. Ένα περιβάλλον που μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολο, με χαμηλότερα επίπεδα οξυγόνου, λιγότερες θρεπτικές ουσίες και φυσικά εμπόδια ανάπτυξης λόγω των γύρω φυσιολογικών ιστών. Ο απόγονος αυτού του καλά προσαρμοσμένου κυττάρου συνεχίζει να διαιρείται σχηματίζοντας τελικά τον όγκο. Έτσι λοιπόν σχηματίζονται οι όγκοι και καθώς συμβαίνουν πρόσθετες μεταλλάξεις τα κύτταρα που τις φέρουν αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Ο λόγος για τον οποίο απαιτούνται τόσες μεταλλάξεις είναι γιατί οι κυτταρικές διαδικασίες ελέγχονται από πολύπλοκους και αλληλοεξαρτώμενους μηχανισμούς. Τα κύτταρα υιοθετούν πολλούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς που τα βοηθούν να διατηρήσουν τον αυστηρό και ακριβή έλεγχο της συμπεριφοράς τους. Άρα πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα θα έπρεπε να διαταραχθούν, προτού μπορέσει ένα κύτταρο να αποβάλλει τους φυσιολογικούς περιορισμούς του για να συμπεριφερθεί ως ένα κακοήθες καρκινικό κύτταρο.

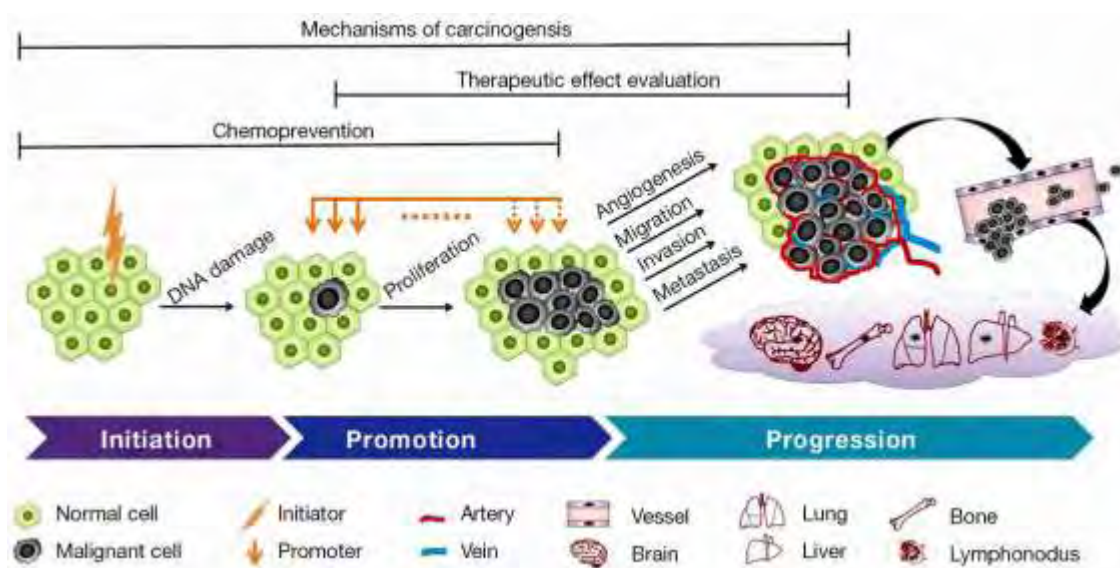
Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (Εικόνα 1):

1. Έναρξη: Σε αυτό το στάδιο από την επίδραση ενός παράγοντα γίνονται μεταλλάξεις σε γονίδια που ελέγχουν το πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οδηγώντας με αυτό το τρόπο στο σχηματισμό ενός 'αρχικού' κυττάρου το οποίο λόγω της μετάλλαξης έχει την ικανότητα να κάνει πολύ μεγαλύτερο αριθμό διαιρέσεων σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Ουσιαστικά προδιαθέτει το κύτταρο για κακοήγη εξέλιξη, το κύτταρο δεν είναι ακόμα καρκινικό, αλλά ακολουθεί μια πορεία προς την εξαλλαγή. Το κύτταρο σε αυτή τη φάση έχει μία μόνιμη

μετάλλαξη, μία γενετική αλλαγή και από την διαίρεση του, όλα τα θυγατρικά κύτταρα θα φέρουν αυτήν την αλλαγή. Ο φαινότυπος αυτών των κυττάρων είναι ίδιος με των φυσιολογικών.

2.Προαγωγή: Είναι το στάδιο στο οποίο μια 'κρίσιμη' μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρώτου προκαρκινικού κυττάρου όπου σημειώνεται αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

3.Πρόοδος: Το προκαρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε ένα αυτόνομο καρκινικό κύτταρο εξαιτίας νέων μεταλλάξεων. Χάνεται η ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Τα χαρακτηριστικά αυτού του κυττάρου είναι η ικανότητα για γρήγορη ανάπτυξη, διήθηση, μετανάστευση, αγγειογένεση αλλά και για μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που είναι αποτέλεσμα των πολλών μεταλλάξεων (34,36).



Εικόνα 1: Πορεία καρκινογένεσης (<http://qims.amegroups.com> )

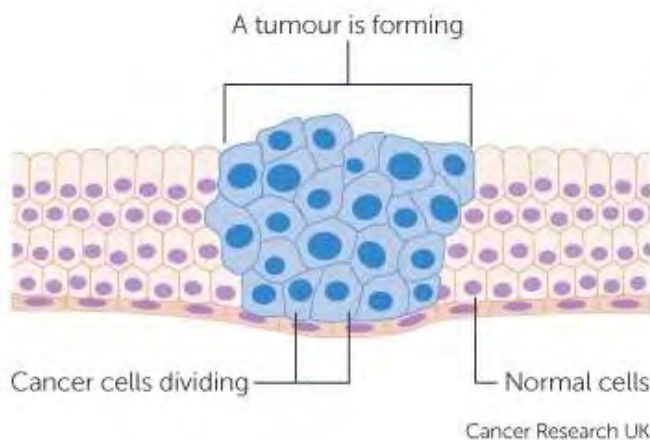
### 1.2.1 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι τα ακόλουθα:

#### 1.Ανεξέλεγκτη ικανότητα πολλαπλασιασμού – Αθανатоποίηση

Είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης η οποία ενισχύει τη λειτουργία των πρωτοογκογονιδίων οπότε τα καρκινικά κύτταρα δεν σταματούν να διαιρούνται. Έτσι τα κύτταρα διπλασιάζονται συνεχώς δημιουργώντας ένα εξόγκωμα, τον όγκο που αποτελείται από πολλά αντίγραφα του αρχικού κυττάρου. Η ικανότητα των κυττάρων για απεριόριστο αριθμό μιτώσεων ελέγχεται από τα τελομερίδια και το ένζυμο τελομεράση. Τα τελομερίδια είναι συμπλέγματα νουκλεοπρωτεϊνών στο τέλος των χρωμοσωμάτων και είναι υπεύθυνα για το 'κλείσιμο' της διπλής έλικας του DNA καθώς εμπλέκονται και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Κατά το διπλασιασμό του DNA, η DNA πολυμεράση αδυνατεί να αντιγράψει όλες τις βάσεις των τελομεριδίων με

αποτέλεσμα κατά τη κυτταρική διαίρεση να βραχύνονται και να χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού, κάτι που στα φυσιολογικά κύτταρα αντιμετωπίζεται από τη τελομεράση. Στα καρκινικά κύτταρα η δράση της τελομεράσης είναι αυξημένη σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που είναι ελαττωμένη (36, 35).



Εικόνα 2: Τρόπος ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων (από: <http://www.cancerresearchuk.org> ).

## **2.Αποφυγή απόπτωσης – προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου**

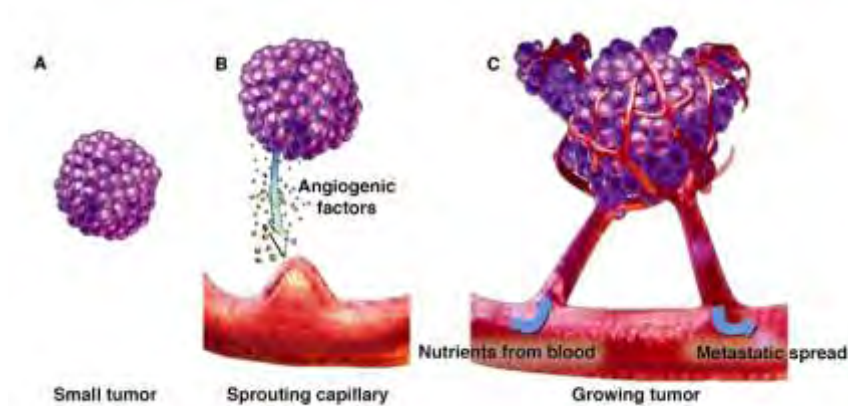
Τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στην απόπτωση λόγω μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Το γονίδιο p53 παράγει μία πρωτεΐνη η οποία φυσιολογικά, σε περίπτωση που υπάρχει βλάβη στο DNA, υποξία ή ενεργοποίηση ογκογονιδίων, οδηγεί σε απόπτωση ή διακοπή του κυτταρικού κύκλου (35).

## **3.Αυτάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες**

Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και απελευθερώνουν από μόνα τους, τους αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι στη συνέχεια ενώνονται σε υποδοχείς και δίνουν το σήμα για το πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που παίρνουν σήματα από εξωκυτταρικούς παράγοντες (35).

## **4.Αγγειογένεση**

Η αύξηση και διατήρηση των όγκων αλλά και η ικανότητα μεταστάσεων εξαρτάται από την αιματική ροή και τη παροχή του απαιτούμενου οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Η αγγειογένεση είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό των καρκινικών κύτταρων και η αιτία για το 90% των θανάτων από καρκίνο (35).



Εικόνα 3: Αγγειογένεση σε όγκο (από: <http://www.angioworld.com> )

### 5. Διεσδυτικότητα σε ιστούς – μεταστάσεις

Μια διαδικασία κατά την οποία το καρκινικό κύτταρο διεσδύει σε γειτονικούς ιστούς και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και του λεμφικού συστήματος μπορούν και μετακινούνται σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος και να δημιουργούν καινούργιες εστίες κακοήθειας. (35)



Εικόνα 4: Μετάσταση όγκων (από: <https://www.shutterstock.com/> )

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα συνοψίζονται στο πίνακα 1.

Πίνακας 1: Τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα:

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
<b>1. ΔΟΜΗ:</b>	
Το DNA στα χρωμοσώματα και τα γονίδια ακολουθούν φυσιολογική οδό ανάπτυξης	Αναπτύσσουν μια διαφορετική δομή DNA ή γονιδίων ή αποκτούν μη φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων
<b>2. ΔΙΑΙΡΕΣΗ – ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ</b>	
Τα κύτταρα διαιρούνται με τάξη για να παραχθούν περισσότερα, μόνο όταν τα χρειάζεται ο οργανισμός	Τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται χωρίς έλεγχο διαμορφώνοντας μία μάζα, τον όγκο.
<b>3. ΑΙΜΑΤΩΣΗ</b>	
Αιμάτωση γίνεται από το κανονικό αγγειακό σύστημα	Επειδή δεν αιματώνονται κανονικά αναπτύσσουν ένα δικό τους δίκτυο
<b>4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	
Οι αυξητικοί παράγοντες για τη παραγωγή φυσιολογικών κύτταρων έχουν τέτοια δραστηριότητα ώστε να υπάρχει ισορροπημένη παραγωγή	Παρατηρείται αυξημένη παραγωγή αυξητικών παραγόντων για τη παραγωγή μεγάλου αριθμού κύτταρων
<b>5. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ</b>	
Τα ένζυμα και οι ορμόνες λειτουργούν με ισορροπημένο τρόπο	Τα ένζυμα και οι ορμόνες βρίσκονται σε υπό- ή υπέρ- λειτουργία.
<b>6. ΟΓΚΟΙ</b>	
Καλοήθης : Δεν διηθούν τους γειτονικούς ιστούς, ούτε μετατίθενται σε άλλα μέρη του σώματος. Μπορούν να αφαιρεθούν και δεν αποτελούν απειλή για τη ζωή.	Κακοήθης : Μπορούν να εισβάλουν και να βλάψουν γειτονικού ιστούς και όργανα.

## 1.3 ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

### 1.3.1 Ήπαρ

Το ήπαρ είναι ένα μεγάλο όργανο που βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της κοιλιάς. Έχει βάρος κοντά στα 3 Kg και χρώμα καφέ κόκκινο. Οι λειτουργίες του είναι να φιλτράρει το αίμα που έρχεται από το πεπτικό σύστημα πριν την διοχέτευση στο υπόλοιπο σώμα, η αποτοξίνωση του οργανισμού από χημικές ουσίες αλλά και ο μεταβολισμός φαρμάκων. Επιπλέον παίζει ρόλο στη διαδικασία αφομοίωσης, απορρόφησης και πέψης τροφών καθώς και στην παραγωγή σημαντικών πρωτεϊνών για τη πήξη του αίματος (37).

Ανατομικά το ήπαρ βρίσκεται στο άνω δεξί τεταρτημόριο της κοιλιάς. Στην κάτω επιφάνεια του υπάρχουν η πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία. Τα αγγεία διαιρούνται σε τριχοειδή και το καθένα από αυτά καταλήγει σε λοβίο. Το κάθε λοβίο αποτελείται από εκατομμύρια ηπατοκύτταρα. Στην κάτω επιφάνεια του δεξιού λοβίου υπάρχει η χοληδόχος κύστη. Η αγγειακή παροχή περιλαμβάνει δύο πηγές, την ηπατική αρτηρία και την πυλαία φλέβα. Η ηπατική αρτηρία προέρχεται από την κοιλιακή αρτηρία και συνεισφέρει το 25 - 30 % της αιματικής ροής. Η πυλαία φλέβα παρέχει το 75 - 80 % της αιματικής ροής. Η παροχή οξυγόνου γίνεται εξ ημισείας και από τις δυο πηγές αυτές (2).



Εικόνα 5: Ανατομία ανθρώπινου ήπατος (από: <https://www.shutterstock.com/> )

### 1.3.2 Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα

Ο καρκίνος του ήπατος μπορεί να είναι πρωτοπαθής και να αφορά τα ηπατικά κύτταρα ή δευτεροπαθής – μεταστατικός και να οφείλεται σε μετάσταση κάποιου άλλου καρκίνου στο ήπαρ, όπου η πρωτοπαθής εστία δεν είναι το ήπαρ. Όταν γίνεται λόγος για καρκίνο του ήπατος ως επί το πλείστον εννοείται ο πρωτοπαθής, σε αντίθετη περίπτωση δίνεται διευκρίνιση. Εξ'ορισμού καρκίνος του ήπατος είναι ο όγκος που εμφανίζεται αρχικά στον ιστό του ήπατος και διαφοροποιείται ακολουθώντας σε κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο των ηπατικών κύτταρων. Ο κυριότερος τύπος καρκίνου του ήπατος είναι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και αποτελεί το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του ήπατος.



**Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)** είναι ένα από τα πιο σοβαρά, με υψηλό ποσοστό νοσηρότητας και θνησιμότητας και ταυτόχρονα έχει κακή πρόγνωση. Ωστόσο οι θεραπευτικές επιλογές είναι λίγες, καθώς η χρησιμοποιούμενη κυρίως θεραπεία σήμερα είναι η χημειοθεραπεία που όμως παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα σε υγιή κύτταρα και αυτό είναι ένα σημαντικό εμπόδιο στην επιτυχή θεραπεία του καρκίνου. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι μια πρωτοπαθής κακοήθεια του ήπατος και εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια και κίρρωση. Τα κύτταρα από τα οποία δημιουργείται πιστεύεται ότι είναι ηπατικά βλαστοκύτταρα. Οι όγκοι αναπτύσσονται τοπικά ή διάσπαρτα μέσα στο ήπαρ αλλά και με απομακρυσμένες μεταστάσεις (2).

#### **1.3.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία**

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) είναι η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Εμφανίζεται με υψηλότερη συχνότητα σε Ασία και Αφρική παρά σε ΗΠΑ και Ευρώπη, αυτό οφείλεται στο υψηλό ποσοστό επιπολασμού της ηπατίτιδας σε αυτές τις χώρες, η οποία προκαλεί κίρρωση που ακολουθείται από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Όσον αφορά την Ευρώπη τα στοιχεία λένε ότι 10 στους 1000 άντρες αλλά και 2 στις 1000 γυναίκες θα αναπτύξουν HCC. Το 2008 διαγνώστηκαν στην Ευρώπη περίπου 40,000 άντρες και 20,000 γυναίκες με HCC με μέση ηλικία 50-60 ετών.

Στις ΗΠΑ τα στοιχεία διαφοροποιούνται από την Ευρώπη. Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης του HCC υπερδιπλασιάστηκε από 2,6 σε 5,2 ανά 100,000 πληθυσμό. Για τους Αφρικανούς Αμερικανούς η αύξηση ήταν πολύ πιο μεγάλη από 4,7 σε 7,5 ανά 100,000 πληθυσμό. Ομοίως αυξήθηκε και η θνησιμότητα από 2,8 σε 4,7 ανά 100,000 πληθυσμό. Σε γενικές γραμμές η συχνότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι διπλάσια από τις ανεπτυγμένες. Η υψηλότερη συχνότητα είναι στην Ασία και την Αφρική με τα στοιχεία θνησιμότητας να είναι 33,5 και 23,73 ανά 100,000 πληθυσμό αντίστοιχα για τις δύο αυτές χώρες.

Παρόλα αυτά όμως η συχνότητα δεν αναμένεται να μειωθεί μέσα στα επόμενα χρόνια, αντιθέτως αναμένεται να αυξηθεί λόγω του επιπολασμού του ιού της ηπατίτιδας σε αυτές τις χώρες παρ' όλους τους εμβολιασμούς που γίνονται από τον ΠΟΥ (2,40).

#### **1.3.2.2 Αιτίες και συμπτώματα Ηπατοκυτταρικού Καρκινώματος (HCC)**

Στις περισσότερες περιπτώσεις πριν το καρκίνο παρατηρείται κίρρωση του ήπατος, όπου τα ηπατικά κύτταρα αντικαθιστούνται από ινώδη ιστό και έτσι τα κύτταρα δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά και δεν λειτουργούν κανονικά. Τα ακριβή αίτια αλλά και ο μηχανισμός ανάπτυξης του HCC δεν είναι ακόμη σαφή. Αυτό όμως που είναι γνωστό είναι ότι υπάρχει άμεσος συσχετισμός με την κίρρωση του ήπατος, οπότε λοιπόν και οι παράγοντες κινδύνου για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα θεωρούνται οι αιτίες εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος. Οι παράγοντες κινδύνου να μεν αυξάνουν τη πιθανότητα εμφάνισης του HCC όμως δεν είναι η αιτία της ανάπτυξης του. Υπάρχουν άνθρωποι που ενώ είναι θετικοί σε αυτούς τους παράγοντες δεν θα αναπτύξουν ποτέ ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αλλά και το αντίθετο. Οι παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος είναι:



1.Χρόνια λοίμωξη από τους ιούς της ηπατίτιδας B και C (HBV και HCV αντίστοιχα): Όταν ο ιός παραμένει στο αίμα για περισσότερο από 6 μήνες, προκαλείται μείωση της λειτουργίας του ήπατος. Οι περισσότεροι παθόντες από HCV αναπτύσσουν χρόνια λοίμωξη και ένα ποσοστό αυτών, της τάξης του 30% θα εμφανίσει και κίρρωση ήπατος. Η κίρρωση σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ενώ ο ιός HBV δεν οδηγεί πάντα σε κίρρωση αλλά μπορεί να οδηγήσει απευθείας σε ανάπτυξη του HCC. Αυτή η διαφορά συμπεριφοράς των ιών της ηπατίτιδας οφείλεται στο ότι ο ιός της ηπατίτιδας B HBV είναι ένας DNA ιός και ενσωματώνει το DNA του στο γονιδίωμα του ξενιστή του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων οι οποίες κάνουν τα κύτταρα να ξεφεύγουν από το φυσιολογικό πολλαπλασιασμό τους και κυτταρικό θάνατο. Εν αντιθέσει ο ιός της ηπατίτιδας C, HCV είναι ένας RNA ιός που αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα και δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή.

2.Μακροχρόνια κατανάλωση αλκοόλ: Ο μηχανισμός με το οποίο το αλκοόλ αυξάνει το κίνδυνο για HCC είναι μέσω της κίρρωσης. Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται η ποσότητα του αλκοόλ που καταναλώνεται να είναι ανάλογη με το κίνδυνο.

3.Κληρονομικές ασθένειες ήπατος που οδηγούν σε κίρρωση του ήπατος.

4.Φύλο: Εμφανίζεται με συχνότητα από 4 έως και 8 φορές μεγαλύτερη στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, κάτι το οποίο πιθανώς να σχετίζεται με τον τρόπο ζωής.

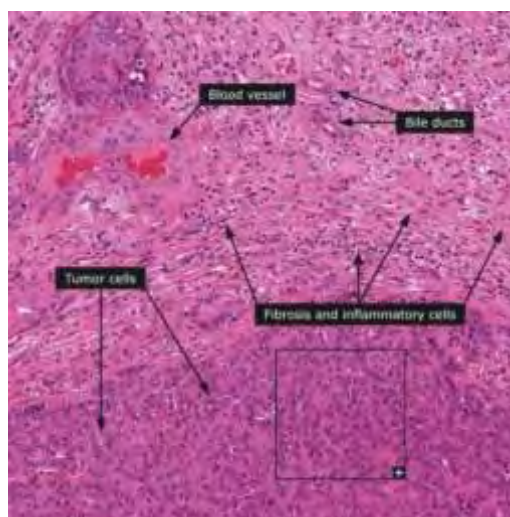
### **1.3.2.3 Διάγνωση και θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος**

#### **Διάγνωση**

Ενώ στο παρελθόν η διάγνωση του HCC γινόταν κυρίως σε προχωρημένο στάδιο με κύρια συμπτώματα τον πόνο στη περιοχή του ήπατος και την απώλεια βάρους, τώρα αναγνωρίζεται όλο και πιο συχνά σε πρώιμο στάδιο. Η έγκαιρη διάγνωση είναι σημαντικό κομμάτι για τη θεραπεία του HCC. Πολλοί ασθενείς στους οποίους η διάγνωση γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, μπορούν να θεραπευτούν μόνο με μεταμόσχευση ήπατος. Σε παγκόσμιο όμως επίπεδο μόνο ένα κλάσμα του συνόλου των ασθενών έχουν πρόσβαση στη μεταμόσχευση, καθώς ακόμη και στον ανεπτυγμένο κόσμο η έλλειψη οργάνων είναι ένα μεγάλο πρόβλημα για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών. Σε τέτοιες περιπτώσεις οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται είναι η αφαίρεση και χημειοθεραπεία, που πιθανών να ανακουφίσουν και να παρατείνουν για λίγο ακόμα το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Επίσης για την έγκαιρη διάγνωση απαραίτητη θεωρείται η παρακολούθηση ασθενών με κίρρωση ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η διαδικασία διάγνωσης περιλαμβάνει την κλινική εξέταση όπου γίνεται αναζήτηση με τη τεχνική της ψηλάφησης για διογκωμένο ήπαρ ή τη παρουσία υγρών στη κοιλιά από τον ιατρό και εξέταση αίματος για αυξημένη άλφα φετοπρωτεΐνη (AFP). Η άλφα φετοπρωτεΐνη είναι ένας καρκινικός δείκτης που εντοπίζεται αυξημένος στο 70 – 80 % των περιπτώσεων καρκίνου του ήπατος (> 200 ng/ml). Επιπρόσθετα γίνεται και ακτινολογική εξέταση με υπερηχογράφημα για εκτίμηση της σύστασης του οργάνου και την αναζήτηση οζιδίων, αλλά και αξονική ή μαγνητική τομογραφία όπου η εικόνα είναι πιο ακριβής και γίνεται πιο εύκολη η αναγνώριση των οζιδίων.

Τέλος η ιστολογική εξέταση με δείγμα από βιοψία ηπατικού ιστού είναι ο μόνος τρόπος για να διαπιστωθεί κατά πόσον ο όγκος είναι καλοήθης ή κακοήθης (40, 5).



Tumor cells / καρκινικά κύτταρα  
Blood vessel / αιμοφόρα αγγεία  
Bile ducts / χοληδόχοι πόροι  
Fibrosis and inflammatory cells / ινώδη και φλεγμονώδη κύτταρα

Εικόνα 6: Μικροσκοπική απεικόνιση HCC (από : <http://www.proteinatlas.org/>)

## Θεραπεία

Η θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος εξαρτάται από το στάδιο, τα χαρακτηριστικά και τους κίνδυνους που συνεπάγονται. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα αναλύονται στη συνέχεια. Αρχικά μπορεί να γίνει χειρουργική εξαίρεση όγκου σε ασθενείς χωρίς κίρρωση του ήπατος και των οπείων, η κατάσταση επιτρέπει χειρουργείο όπου και αφαιρείται τμήμα του ήπατος που έχει τον όγκο, εφόσον το ήπαρ λειτουργεί επαρκώς. Μια δεύτερη θεραπευτική προσέγγιση είναι μεταμόσχευση ήπατος που γίνεται όταν ο όγκος έχει μικρότερη από 5 εκ. διάμετρο ή όταν είναι δύο ή τρεις όγκοι μικρότερης διαμέτρου από 3 εκ. Επιπρόσθετα γίνεται και τοπική εκτομή μια διαδικασία που αφορά τη καταστροφή των καρκινικών κύτταρων με χημικά ή φυσικά μέσα. Μπορεί να γίνει με καυτηρίαση ή ραδιοσυχνότητες όπου εισάγεται καθετήρας από το δέρμα στον όγκο και υψηλής συχνότητας ρεύμα εισέρχεται από το άκρο του καθετήρα και τα κύτταρα θερμαίνονται. Ταυτόχρονα η θερμότητα κλείνει τα γύρω αγγεία για αποφυγή αιμορραγίας. Συστήνεται σε όγκους μικρότερους των 5 εκ διαμέτρου. Ακόμη η τοπική εκτομή μπορεί να γίνει και με διαδερμική έκχυση αιθανόλης όπου γίνεται άμεση έκχυση αιθανόλης για να κάψει τον όγκο.

Άλλες θεραπευτικές μέθοδοι είναι α) Διατηρητικός Χημειοεμβολιασμός, που συστήνεται σε ασθενείς που βρίσκονται σε αναμονή για μεταμόσχευση. Είναι η έκχυση ενός αντικαρκινικού φαρμάκου συνδεδεμένο με μικρά αποικοδομήσιμα σωματίδια, απευθείας στην ηπατική αρτηρία που τροφοδοτεί το ήπαρ με αίμα. Το φάρμακο στοχεύει στο θάνατο των καρκινικών κύτταρων ή

και στο περιορισμό της ανάπτυξης τους. Τέτοια φάρμακα είναι η δοξορουμπικίνη, η συσταλτίνη και η μιτομυκίνη. β) η Συστηματική θεραπεία, είδος θεραπείας του οποίου γίνεται χρήση όταν ο όγκος έχει επεκταθεί εκτός ήπατος, σε λεμφαδένες και απομακρυσμένα όργανα. Στόχος αυτής της θεραπείας είναι η στόχευση των καρκινικών κύτταρων που βρίσκονται σε όλο τον οργανισμό. Το σκεύασμα που χρησιμοποιείται είναι ένα χάπι το **Sorafenib**. Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο. Και τέλος η ακτινοθεραπεία που χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που υπάρχει ένας μεγάλος όγκος με μικρότερους όγκους γύρω του. Σκοπός αυτού του είδους θεραπείας είναι ο θάνατος των κυττάρων με τη χρήση ακτινοβολίας (40,3,5).

## **2.ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ**

### **2.1. ΓΕΝΙΚΑ**

Με το όρο μεταβολισμός ορίζουμε το άθροισμα των βιοχημικών αντιδράσεων που γίνονται σε έναν οργανισμό με την επίδραση διαφόρων μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες είναι οι ενώσεις που καταλύουν αυτές τις βιοχημικές αντιδράσεις και μπορεί να είναι πρωτογενείς μεταβολίτες ή και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες είναι αυτοί που εμπλέκονται σε διαδικασίες πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης και θεωρούνται απαραίτητοι. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, παρόλο που δεν είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του οργανισμού εν τούτοις η μακροπρόθεσμή απουσία τους μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε γονιμότητα αλλά και φαινότυπο, επίσης λαμβάνουν μέρος σε ποιο ειδικές διεργασίες όπως είναι η άμυνα του οργανισμού.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι συνήθως ενδιάμεσες ενώσεις πρωτογενούς μεταβολισμού και η σύνθεση τους αλλά και η συσσώρευση τους αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών κύτταρων που συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης, δηλαδή το μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων (34). Επιπρόσθετα παρέχουν στον οργανισμό το πλεονέκτημα της επιβίωσης με διάφορους τρόπους, όπως με τη βελτίωση της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, την προστασία από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, την ενίσχυση της ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης με άλλους οργανισμούς (π.χ. αντιβιοτικά και διάφορα σηματοδοτικά μόρια) ή δρώντας ως μηχανισμοί άμυνας (6).

Πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες αποδείχθηκαν στην χρήση τους απαραίτητοι για τον άνθρωπο αφού χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική ως δραστικά συστατικά φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται δηλαδή ως αντιβιοτικά, παράγοντες ενάντια σε διάφορα είδη καρκίνου, ως φάρμακα ενάντια σε ιούς, αντιπυρετικά (ασπιρίνη), παραισθησιογόνα (LSD) αλλά και ως φάρμακα για τη μείωση της χοληστερόλης. Επιπρόσθετα χρήση τους γίνεται και ως ζιζανιοκτόνα, ως πρόσθετα τροφίμων (χρώμα, άρωμα, γλυκαντικά), καθώς χρησιμοποιούνται επιπλέον για τη δημιουργία αρωμάτων και για τη παραγωγή πλαστικού (6).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφοροποιούνται σε τρεις κατηγορίες. Οι κατηγορίες αυτές είναι:

1.Φαινολικές Ενώσεις: Ενώσεις που ορίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων που φέρουν μια λειτουργική υδροξυλική ομάδα. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι το σαλικυλικό οξύ, το οποίο δρα ενάντια σε μύκητες αλλά και τα παράγωγα του όπως η ασπιρίνη που μειώνει την ένταση σε πόνο, φλεγμονή και πυρετό. Άλλο ένα παράδειγμα είναι οι ισοφλαβόνες, που συντίθενται από μία οικογένεια φυτών όταν αυτά προσβληθούν από βακτήρια και μύκητες και παρουσιάζουν αντί μικροβιακή δράση. Ακολουθώντας ακόμη ένα πολύ σημαντικό μόριο αυτής της ομάδας ενώσεων είναι η λιγνίνη το κύριο συστατικό του ξύλου που επιτρέπει την επέκταση του ύψους, της περιμέτρου και της μακροζωίας. Μια ιδιαίτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων είναι οι προσελκύσθηκες, οι οποίες δίνουν χρώμα στα φυτά και έτσι προσελκύουν τα έντομα με σκοπό να βοηθήσουν στην επικονίαση.

2.Αζωτούχοι Δευτερογενείς Μεταβολίτες: Προέρχονται κυρίως από αμινοξέα και αποτελούνται από αλκαλοειδή, μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, αμίνες και ισταμίνη.

3.Τερπένια: Παράγονται από τη βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού οξέος και του ακέτυλο- συνένζυμου Α ( CoA). Προέρχονται από τη βασική μονάδα του ισοπρενίου – ισοπεντάνιο ( 5 άτομα άνθρακα, 5C ). Είναι περισσότερα από 23,000 με διαφορετική δομή το καθένα (39).

## 2.2 ΤΕΡΠΕΝΙΑ – ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ

### 2.2.1 Τερπένια

Είναι η μεγαλύτερη οικογένεια φυσικών προϊόντων, έχουν απομονωθεί περισσότερες από 23,000 ενώσεις. Έχουν διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους στα φυτά όπως ορμόνες, φωτοσυνθετικές χρωστικές και μεταφορείς ηλεκτρονίων. Είναι υπεύθυνα για φυσιολογικές, μεταβολικές και δομικές λειτουργίες, επίσης εξυπηρετούν την άμυνα και την επικοινωνία (7).

Είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία στη δομή τους. Κάποια είναι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν οξυγόνο, άλλα είναι μόρια ανοικτής αλυσίδας και άλλα περιέχουν δακτύλιο. Χαρακτηρίζονται από τη παρουσία ενός αριθμού ατόμων άνθρακα ίσο με 5 η βασική δομή που τα διακρίνει είναι το ισοπρένιο. Ανάλογα με το μοριακό βάρος και τα πολλαπλάσια της μονάδας ισοπρενίου χαρακτηρίζονται ως μονοτερπένια (10 άτομα άνθρακα - 10 C), σερκιτερπένια (15 C), διτερπένια (20 C), τριτερπένια (30 C) και τετρατερπένια (40 C) (8).

Πίνακας 2: Ταξινόμηση Τερπενοειδών

Άτομα άνθρακα (C )	Μονάδες Ισοπρενίου	Ταξινόμηση	Τύπος
5	1	Ημιτερπενοειδή (ισοπρένια)	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>
10	2	Μονοτερπένια	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
15	3	Σερκιτερπένια	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
20	4	Διτερπένια	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
25	5	Σεστετερπένια	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>
30	6	Τριτερπένια	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>
40	8	Τετρατερπένια	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>

Τα τερπένια επίσης ομαδοποιούνται και ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων τους σε : Άκυκλοι (με ένα ανοικτό δακτύλιο), Μονοκυκλικοί (με ένα δακτύλιο), Δίκυκλικοί (με δύο δακτύλιους), Τρικυκλικοί (με τρεις δακτύλιους), Τετράκυκλικοί (με τέσσερις δακτύλιους) (38).

### 2.2.2 Βιοσύνθεση Τερπενοειδών

Ένα φυτό μπορεί να συνθέσει πολλά διαφορετικά είδη τερπενοειδών σε διαφορετικούς χρόνους για διαφορετικούς σκοπούς. Επειδή όλα τα τερπένια παράγονται από ένα κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι υπάρχουν μηχανισμοί ελέγχου.

Αρχικά πρέπει να γίνει μετατροπή του ακέτυλο - CoA στην ενεργή μορφή του ισοπρενίου το IPP – ισοπεντυνέλιο. Για να γίνει αυτό στο ακέτυλο - CoA προστίθενται αλλά δύο μόρια ακέτυλο – CoA (γίνεται σύντηξη 3 μορίων ακέτυλο – CoA). Όλο αυτό οδηγεί στη δημιουργία του 3 – ύδροξυ- 3 – μεθυλογλουταρυλο –CoA (HMG- CoA ) με την επίδραση των συνθάσης και θειολάσης.

Ακολούθως γίνεται αναγωγή του σε μεβαλονικό οξύ, το οποίο φωσφορυλιώνεται από την κινάση μεβαλονικού οξέος και τη κινάση του 5–πυροδιφωσφορικού μεβαλονικού οξέος οδηγώντας στη δημιουργία πυροφωσφορικού μεβαλονικού οξέος (MVA – PP). Στη συνέχεια γίνεται αποκαρβοξυλίωση του 5 διφωσφορικού μεβαλονικού οξέος με τη χρήση ATP και προκύπτει το IPP. Το IPP διμερίζεται μέσω της ισομεράσης σε DPP.

Έπειτα γίνεται συμπύκνωση των δυο ισομέρων και προσθήκη ενός ακόμα IPP προς το σχηματισμό ενός GPP που είναι μονοτερπένιο. Και ακολούθως ανάλογα με το τι θα παραχθεί γίνονται προσθήκες IPP. Δηλαδή στο GPP γίνεται προσθήκη ενός IPP και έτσι παράγεται το FPP που έχει 15 άτομα άνθρακα και είναι ένα σερκιτερπένιο. Στο FPP μετά γίνεται προσθήκη και πάλι ενός IPP και σχηματίζεται το GGPP που έχει 20 άτομα άνθρακα και είναι ένα διτερπένιο. Εν κατακλείδι από το διμερισμό του FPP δημιουργείται ένωση με 30 άτομα άνθρακα, από την οποία και αφαιρούνται 2 ομάδες πυροφωσφορικού (2PP) και δημιουργείται έτσι το σκουαλένιο, που είναι το πρόδρομο των τριτερπενίων και των στεροειδών. Από το διμερισμό του GGPP παράγεται ένωση με 40 άτομα άνθρακα από την οποία όταν αφαιρεθούν 2 ομάδες πυροφωσφορικού (2 PP ), δημιουργείται το φυτοένιο , που είναι πρόδρομο των τετρατερπενίων (7). (Εικόνα 7)

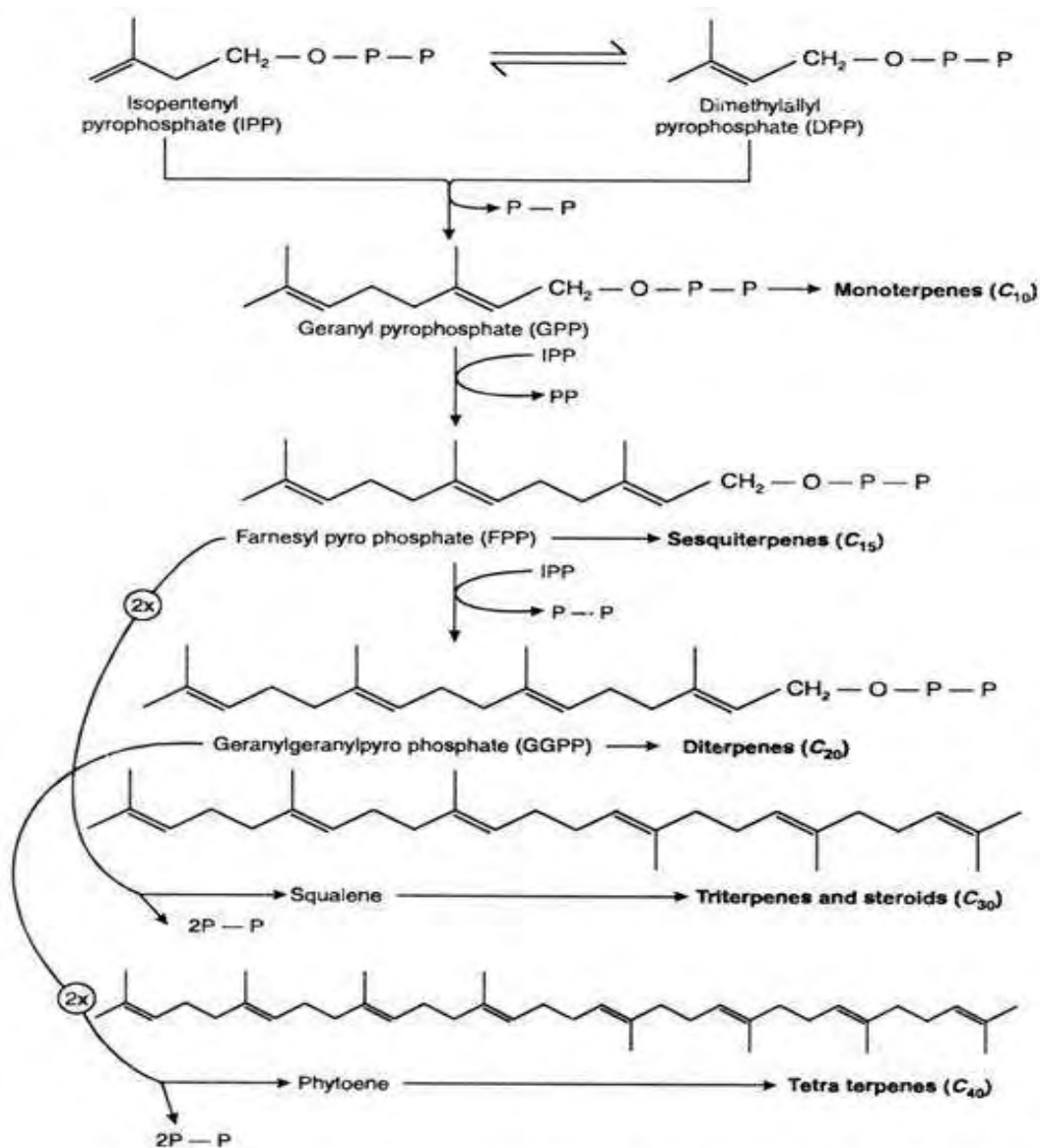


Fig. 24.3. Biosynthesis of various categories of terpenes from activated 5-C units, IPP & DPP.

Εικόνα 7: Βιοσύνθεση Τερπενοειδών (από: <http://www.biologydiscussion.com/> )

## 2.3 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ

### 2.3.1 Γενικά

Είναι φυσικές ουσίες ιδιαίτερα διαδεδομένες στη φύση. Έχουν βρεθεί σε φυτά και σε φρούτα όπως μήλα, σύκα, ελιές, λεβάντα, θυμάρι, ρίγανη, δενδρολίβανο καθώς και σε θαλάσσιους οργανισμούς όπως είναι τα φύκια αλλά και σε μύκητες. Για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούνταν ανενεργά. Την τελευταία δεκαετία ήρθαν στο φως στοιχεία για ένα εκτεταμένο φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων τους σε συνδυασμό βέβαια με το χαμηλό προφίλ τοξικότητάς τους, κάτι που τράβηξε το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Η δράση τους και οι ιδιότητες τους δεν είναι κάτι πρωτοφανές καθώς για αρκετά χρόνια γινόταν χρήση τους στην Ασιατική ιατρική. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν τις ιδιότητες τους. Χρησιμοποιούνται λοιπόν ως αντιφλεγμονώδη, αναλγητικά, αντιπυρετικά, ως ηπατοπροστατευτικά, ηρεμιστικά, καρδιοτονωτικά, αντιοξειδωτικά, αντί μικροβιακά, αντιικά και αντιαλλεργικά. Αξιοσημείωτο είναι ότι μεγάλος αριθμός τριτερπενίων έδειξε αντικαρκινική δράση, ήταν δηλαδή κυτταροτοξικά έναντι διαφόρων τύπων καρκινικών κύτταρων, χωρίς την εμφάνιση τοξικότητας στα φυσιολογικά κύτταρα. Το γεγονός ότι η τοξικότητα τους είναι συνήθως χαμηλή και άρα θεραπευτικός δείκτης (TI) τους είναι υψηλός υποδηλώνει την ικανότητα για πιθανή χρήση τους ως θεραπευτικά μέσα εναντίον στο καρκίνο.

Επιπλέον μεγάλος αριθμός των τριτερπενίων έχει συντεθεί με τροποποίηση των αρχικών φυσικών ενώσεων με σκοπό τη βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητάς τους. Αυτό οφείλεται σε δύο μειονεκτήματα που έχουν οι αρχικές τους ενώσεις. Το πρώτο μειονέκτημα είναι ότι οι μητρικές ενώσεις δεν είναι αρκετά δραστικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις και παρουσιάζουν χαμηλή τιμή IC<sub>50</sub>, οπότε και οι ερευνητές προσανατολίζονται προς τη δημιουργία καινούργιων ημισυνθετικών τριτερπενίων με σκοπό τη βελτιστοποίηση των μορίων, να αυξήσουν δηλαδή τη δραστικότητα με μειωμένη τοξικότητα ταυτόχρονα. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη μελέτη της σχέσης μεταξύ της δομής και της λειτουργίας αλλά και την αξιολόγηση της τιμής του IC<sub>50</sub>. Το δεύτερο μειονέκτημα των αρχικών ενώσεων είναι οι απρόβλεπτες φαρμακολογικές ιδιότητες των τριτερπενίων όπως για παράδειγμα η διαλυτότητα στο νερό, ένας από τους σημαντικότερους λόγους που ενώ κάποιες ενώσεις *in vitro* είναι αρκετά δραστικές εν τούτοις αποτυγχάνουν σε *in vivo* πειράματα.

Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι τις περισσότερες φορές τα παράγωγα τους φαίνονται να είναι ελαφρώς πιο δραστικά από τις μητρικές τους ενώσεις. Και επίσης κάτι το οποίο αξίζει να σημειωθεί είναι ότι μικρές αλλαγές στη δομή μπορούν να αυξήσουν αλλά και να μειώσουν τη δραστικότητα των ενώσεων. Μεγάλος αριθμός τέτοιων τροποποιημένων τριτερπενίων θεωρούνται σήμερα με βάση μελέτες ισχυρά αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά φάρμακα (11,9,10). Στον πίνακα 3 δίνονται παραδείγματα νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών στις οποίες δρουν κυτταροτοξικά διαφορετικά τριτερπένια.

✚ IC<sub>50</sub>: Είναι η συγκέντρωση ενός φαρμάκου ή αναστολέα που απαιτείται για να αναστείλει μια βιολογική διεργασία κατά το ήμισυ. Είναι δηλαδή η συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή του 50% της βιολογικής διεργασίας.



- ✚ **ΤΙ- Θεραπευτικός Δείκτης:** είναι μια σύγκριση του ποσού που προκαλεί τη θεραπευτική επίδραση με το ποσό που προκαλεί τοξικά αποτελέσματα. Ποσοτικά είναι η αναλογία της δόσης που απαιτείται για να την επιθυμητή θεραπευτική επίδραση και τη τοξική δόση.

Πίνακας 3: Παραδείγματα νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών ευαίσθητων σε κυτταροτοξικές ιδιότητες τριτερπενίων (12).

ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ
<b>Παράγωγα Σκουαλενίου</b>	1. Λευχαιμία
	2. Μελάνωμα
	3. Σάρκωμα
	4. Καρκίνος Προστάτη
	5. Καρκίνος Πνεύμονα
	6. Καρκίνος Μαστού
	7. Τραχηλικό Καρκίνωμα
	8. Καρκίνος ωοθηκών
<b>Λουπεόλη</b>	1. Καρκίνος Παχέος Εντέρου
	2. Γαστρικό Καρκίνωμα
<b>Ολεανολικό οξύ &amp; παράγωγα</b>	1. Καρκίνος θυρεοειδούς
	2. Καρκίνος Ωοθηκών
	3. Καρκίνος Μαστού
	4. Καρκίνος Παχέος εντέρου
	5. Γλοίωμα
	6. Λευχαιμία
<b>Βετουλινικό οξύ &amp; παράγωγα</b>	1. Καρκίνος πνεύμονα
	2. Καρκίνος προστάτη
	3. Καρκίνος μαστού
	4. Καρκίνος παχέος εντέρου
	5. Λευχαιμία
	6. Μελάνωμα
<b>Ουρσολικό οξύ &amp; παράγωγα</b>	1. Καρκίνος ωοθηκών
	2. Παγκρεατικό καρκίνωμα
	3. Καρκίνος προστάτη
	4. Καρκίνος ήπατος
	5. Καρκίνος μαστού
	6. Λευχαιμία

### 2.3.2. Βιολογικές Δράσεις Τριτερπενίων

Στη φύση υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες στις οποίες διαχωρίζονται οι τριτερπενικές ενώσεις με αξιοσημείωτες βιολογικές επιδράσεις. Οι οικογένειες αυτές είναι α) Οικογένεια Oleanane, με πιο σημαντικούς αντιπροσώπους το ολεανολικό οξύ (oleanolic acid), την ερυθροδιόλη και Β – αμυρίνη, β) η οικογένεια Ursane, με πιο σημαντικό το ουρσολικό οξύ και γ) η οικογένεια Lupane, με πιο σημαντικά τη Βετουλίνη (betulin) και το βετουλινικό οξύ (Betulinic acid) (8,13).

Οι βιολογικές δράσεις των οικογενειών αυτών αναλύονται στη συνέχεια

**Α. Αντικαρκινική Δράση:** Όσον αφορά την οικογένεια Lupane είναι γνωστή η αντικαρκινική δράση του βετουλινικού οξέος. Καθώς διάφορες μελέτες έδειξαν την κυτταροτοξική του επίδραση ενάντια σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επίσης είναι σημαντικό και θετικό το γεγονός ότι παρόλο που το βετουλινικό οξύ δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη όγκων εν τούτοις δεν παρουσιάζει πολλές παρενέργειες, και εμφανίζει λιγότερη τοξικότητα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων.

Στην οικογένεια Ursane, το ουρσολικό οξύ δείχνει να έχει κυτταροτοξική δράση σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, και επίσης μπορεί να επάγει απόπτωση σε ανθρώπινο μελάνωμα (8).

Και τέλος στην οικογένεια Oleanane, το ολεανολικό οξύ είναι γνωστό για τις αντικαρκινικές ιδιότητες, αρκετές από τις οποίες αναλύονται στη συνέχεια (κεφάλαιο 2.3.3.). Επίσης μέλη της οικογένειας αυτής έχουν αναδειχθεί αντιαγγειογενετικές και αντιμεταλλαξιογόνες δράσεις τους (8).

**Β. Αντιφλεγμονώδης Επίδραση:** Η αντιφλεγμονώδης επίδραση αποδίδεται στην ικανότητα των τριτερπενίων να αναστέλλουν μέσω διαφόρων μονοπατιών τη δράση της λιποξυγενάσης του αραχιδονικού (5 LO arachidonate 5 lipoxygenase) και των HLC (human clastate leucocyte) αλλά και στην διαμόρφωση της ανοσοαπόκρισης με παραγωγή αντισωμάτων (8). Τα ένζυμα 5 LO είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των λευκοτριενίων, που είναι μόρια σήματος που ευθύνονται για τη φλεγμονώδη απάντηση και υπερευαισθησία που παρατηρείται σε άσθμα, αρθρίτιδα και καρδιοαγγειακές διαταραχές. Η χορήγηση των τριτερπενίων όπως του ολεανολικού οξέος αναστέλλει τη παραγωγή των λευκοτριενίων (8).

**Γ. Αντιαλλεργική Επίδραση:** Σε εξέλιξη βρίσκονται μελέτες για την αντιαλλεργική επίδραση κάποιων τριτερπενίων όπως είναι το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ (8).

**Δ. Αντιμικροβιακή Δράση:** Το βετουλινικό οξύ έδειξε αναστολή έκκρισης σε SAP (ασπαρτική πρωτεϊνάση), που είναι λοιμογόνος παράγοντας μόλυνσης από Candida. Ακόμη διαφορετικά τριτερπένια που απομονώθηκαν από το φυτό Crysanthemum morifolium έχουν παρουσιάσει αντιμυκοβακτηριακή δράση. Τέλος μελετάται η αντιμυκητιακή δράση του βετουλινικού οξέος (8).

**Ε. Δράση εναντία στη τερηδόνα:** Στην ανατολική ιατρική γίνεται εδώ και αρκετό καιρό χρήση του ολεανολικού οξέος για τη πρόληψη της φθοράς των δοντιών από την τερηδόνα (8).

**Στ. Αντιική δράση:** Ανασταλτική δράση ενάντια στον HIV παρουσίασε το βετουλινικό οξύ, και τα παράγωγα του προστατεύοντας τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος των ανθρώπων. Μάλιστα τα παράγωγα του βετουλινικού οξέος φαίνεται ότι διαθέτουν έναν

θεραπευτικό δείκτη καλύτερο από τη μητρική ένωση. Έχει περιγραφτεί ότι με τη δράση τους τα παράγωγα του βετουλινικού οξέος, μετατρέπουν πρόδρομα πρωτεϊνικά καψίδια σε ώριμα και αυτά με τη σειρά τους δρουν ενάντια σε ανθεκτικά στοιχεία του HIV (14,8). Ακόμη το ολεανολικό οξύ μπορεί να αναστείλει την ωρίμανση του HIV με αναστολή του διμερισμού του. Επιπρόσθετα το ουρσολικό οξύ παρουσίασε αντιική δράση ενάντια στον HSV -1 (8).

**Ζ. Ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες:** Το ουρσολικό και ολεανολικό οξύ σε μελέτες παρουσίασαν ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Το ολεανολικό οξύ μάλιστα βρέθηκε να προκαλεί αναστολή της δράσης ενζύμων που παίζουν ρόλο σε βλάβες του ήπατος (8).

**Η. Αναλγητική δράση:** Φλοιός ενός βραζιλιάνικου δένδρου χρησιμοποιείται στη παραδοσιακή ιατρική ως τονωτικό για την θεραπεία άσθματος. Επιπρόσθετα τριτερπενικές ουσίες που απομονώθηκαν από τον φλοιό αυτό δρουν ενάντια στο πόνο, χωρίς παρενέργειες (8).

### 2.3.3 Βιολογικές Δράσεις Ολεανολικού Οξέος

Το ολεανολικό οξύ απαντάται παντού στο φυτικό βασίλειο, και είναι ένα τριτερπενοειδές που απομονώνεται από ποίκιλα είδη φυτών όπως τα *Beta Vulgaris*, *Momordica Cochinchinesis*, *Tiarella Polyphylla* και *Clerodendron spicatus*. Οι δημοσιεύσεις και οι ερευνητικές εργασίες αποδεικνύουν ότι το ολεανολικό οξύ είναι ένα τριτερπενοειδές που διαθέτει ποικιλία φαρμακευτικών ιδιοτήτων, τόσο αυτό όσο και συνθετικά παράγωγα του. Είναι αρκετά κοινό υπό μορφή ελεύθερου οξέος και βρίσκεται σε φρούτα, τρόφιμα, διάφορα φυτά και βότανα.

Έχει σημαντικές βιολογικές δράσεις στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η αντικαρκινική δράση έναντι διαφόρων όγκων, καθώς και αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιικές, αντιαγγειογενετικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές, ηπατοπροστατευτικές και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Αναλυτικά, κάποια παράγωγα του ολεανολικού οξέος, βρέθηκε ότι δρουν ενάντια σε διαφορετικές καρκινικές σειρές σημειώνοντας σημαντικά επίπεδα κυτταροτοξικότητας ενάντια σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα KB του επιδερμικού καρκινώματος και τη καρκινική σειρά HT 29 του παχέος εντέρου. Επιπροσθέτως, η επώαση καρκινικών κύτταρων HCT 15 του παχέος εντέρου, με ολεανολικό οξύ ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου και προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Επίσης μελετάται η ανασταλτική επίδραση ενάντια στην αγγειογενετική διαδικασία, καθώς πειράματα σε κύτταρα βοοειδούς έδειξαν ότι η επίδραση του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αορτικών ενδοθηλίων.

Πολύ σημαντική είναι η δράση του ολεανολικού οξέος ενάντια στον ιό HIV (ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας). Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι το ολεανολικό οξύ, αλλά και κάποια από τα παράγωγα του δρουν εναντία στον ιό HIV, είτε αναστέλλοντας την αντιγραφή του ιού HIV, είτε μέσω της αναστολής των κυττάρων H9.

Αποτελεσματική είναι η δράση του και ενάντια στην ανάπτυξη διάφορων εντερικών βακτηρίων, όπως είναι το *E.Coli*, *Clostridium Clostridiiforme*, *Enterobacter* και *Salmonella Typhimurium* (15). Επιπλέον το συγκεκριμένο οξύ που απομονώνεται από το φυτό *Lulla Cylidrica* μπορεί *in vitro* να αναστείλει την ανοσολογική αιμόλυση (immunoemolysis). Ιδιαίτερως

εντυπωσιακό είναι ότι σε πειράματα για την αξιολόγηση της δράσης του σχετικά με τη γονιμότητα σε αρουραίους φάνηκε να έχει την ικανότητα να μειώσει τη γονιμοποίηση χωρίς μάλιστα να προκαλεί ανωμαλίες σε σπερματοκύτταρα ή στα κύτταρα sertoli. Άρα η χρήση του έναντι της γονιμότητας είναι πολύ υποσχόμενη, και πιθανόν αυτή η ιδιότητα του να το καταστήσει μελλοντικά ως ένα μέσο ενάντια της. Αξιοσημείωτη επίσης θεωρείται και η δράση του ενάντια στο γαστρικό έλκος, αφού αυτό και τα παράγωγα του οδηγούν, στην επούλωση του έλκους.

### **Ολεανολικό οξύ και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα**

Σημαντική είναι η δράση του ολεανολικού οξέος στο ήπαρ και κυρίως στη κυτταρική σειρά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Παρουσιάζει αντικαρκινική και αποπτωτική δράση, που προκαλείται μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου και διαταραχής του δυναμικού της μεμβράνης στην ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά HepG2. Η απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης υποδηλώνει ότι η εξωτερική μεμβράνη έχει αυξήσει τη διαπερατότητα της μέσω της δημιουργίας πόρων. Διάφορα πειράματα αποδεικνύουν την δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη επίδραση του ολεανολικού οξέος στην αναστολή της ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Η επώαση με το οξύ αυτό προκάλεσε στα κύτταρα μορφολογικές αλλαγές σχετικές με την απόπτωση. Η απόπτωση είναι μια εξαιρετικά οργανωμένη βιοχημική διαδικασία η οποία οδηγεί σε θάνατο τα τραυματισμένα και γερασμένα κύτταρα. Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν κατά την απόπτωση περιλαμβάνουν την συρρίκνωση κυττάρων, διόγκωση μεμβράνης, συμπύκνωση πυρήνα και δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων. Επιπρόσθετα όσον αφορά στην επαγόμενη απόπτωση από την χορήγηση ολεανολικού οξέος σε κύτταρα HepG2 παρατηρήθηκε ότι πραγματοποιείται η αναστροφή της PS ( Phosphatidy serine) από την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης προς την εξωτερική. Η PS είναι ο δείκτης απόπτωσης, οπότε ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων προσδιορίζεται μέσω της PS.

Το ολεανολικό οξύ επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στη φάση G1. Με ανάλογο τρόπο, προκαλεί κατακερματισμό του πυρηνικού DNA, διάσπαση δηλαδή του DNA και δημιουργία θραυσμάτων του, με επακόλουθο τον κυτταρικό θάνατο. Έρευνες έδειξαν ότι το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξική δράση ενάντια στα HepG2 κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε συγκεντρώσεις των 25μM και 50μM η κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται είναι 31,7% και 54,2% αντίστοιχα(16)

### **2.3.4. Βιολογικές Δράσεις Σελαστρόλης**

Είναι ένα τριτερπενοειδές το οποίο απομονώθηκε από το φυτό *Tripterygium wilfordii* το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στη κινέζικη ιατρική ως φυσική θεραπεία για περισσότερα από 2.000 χρόνια. Την προηγούμενη δεκαετία είχε γίνει το επίκεντρο για πολλές προκλινικές μελέτες και είχε αποδειχτεί σημαντική η χρήση της σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών (17).

Η σελαστρόλη έχει βρεθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, σε επαγωγή της απόπτωσης, σε καταστολή της διεισδυτικής ικανότητας των όγκων, και της ικανότητας για μετάσταση, αλλά και σε διακοπή της αγγειογένεσης, σε πληθώρα καρκινικών

κυτταρικών σειρών (18). Στη συνολική αντικαρκινική δράση της ένωσης αυτής προστίθεται και η ικανότητα της να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα σε άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η σελαστρόλη μπορεί να δράσει ενάντια του γλοιώματος, του μελανώματος, του καρκίνου του προστάτη και της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Επιπρόσθετα έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα για την θεραπεία αυτοάνοσων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ωστόσο η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με το στόχο και το μηχανισμό δράσης παρεμποδίζουν τη κλινική εφαρμογή της (19). Μελέτες έδειξαν ότι η σελαστρόλη επάγει την κυτταροτοξικότητα με αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου και επάγοντας την απόπτωση μέσω της συσσώρευσης δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Οι ROS σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση μορίων οξυγόνου με τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από τις μιτοχονδριακές αναπνευστικές αλυσίδες (MRC) και η συσσώρευση τους προκαλεί διακοπή του κύκλου και οδηγεί σε απόπτωση. Η συσσώρευση αυτή προκαλείται από αναστολή της δράσης αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών στις MRC από την επίδραση της σελαστρόλης (19).

Επιπλέον βρέθηκε ότι δρα ενάντια στο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του προστάτη, εν τούτοις η χρήση της δεν υφίσταται λόγω της υδρόφοβης φύσης του φαρμάκου. Παρόλα αυτά οι μελέτες έδειξαν πως η ενσωμάτωση της σε λιποσώματα μπορεί να παρακάμψει το πρόβλημα της διαλυτότητας στο νερό. Αυτό οφείλεται στη διπλή στοιβάδα των λιποσωμάτων η οποία επιτρέπει τη φόρτωση υδροφοβικών αλλά και υδρόφιλων φαρμάκων. Έτσι τα υδρόφοβα φάρμακα μπορούν να ενσωματωθούν εντός της διπλοστοιβάδας και τα υδρόφοβα στον υδάτινο πυρήνα (20).

Επιπρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι η σελαστρόλη μπορεί να αναστείλει το πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του πολλαπλού μυελώματος ή να ξεπεράσει την αντίσταση τέτοιων κυττάρων στη χημειοθεραπεία μέσω της αναστολής μεταγραφικών παραγόντων NF – κβ και της STAT3 η οποία μπορεί να οδηγήσει στη προς τα κάτω ρύθμιση των αντί αποπτωτικών γονιδίων (21). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η σελαστρόλη σε συνδυασμό με τη Lapatinib, παρουσιάζει ισχυρή αναστολή ανάπτυξης και επαγωγή απόπτωσης (22).

### **Σελαστρόλη και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα**

Η σελαστρόλη επάγει την απόπτωση σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Έρευνες έδειξαν πως η ενεργοποίηση του παράγοντα STAT3 παίζει σημαντικό ρόλο στο πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετάσταση και την αγγειογένεση συνεισφέροντας στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Παράγωγα που αναστέλλουν την ενεργοποίηση του παράγοντα STAT3 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία του HCC. Η επίδραση μορίων της σελαστρόλης αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα STAT3 μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μορίων του αντίστοιχου μονοπατιού. Αυτή η αναστολή μειώνει την επιβίωση των κύτταρων, και αναστέλλει την έκφραση γονιδίων για το πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και αναστολή της απόπτωσης με αποτέλεσμα την καταστολή του πολλαπλασιασμού (18).

Μία άλλη μελέτη σχετίζει την επίδραση της σελαστρόλης με την αγγειοτενσίνη II για την αναστολή του πολλαπλασιασμού σε κύτταρα HepG2. Η αγγειοτενσίνη II είναι ένας σημαντικός

παράγοντας που προωθεί το πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, ενώ η σελαστρόλη είναι μια ένωση που υπέδειξε αντικαρκινική δράση ενάντια σε διάφορες καρκινικές σειρές (23). Μελετήθηκε λοιπόν η επίδραση της σελαστρόλης ενάντια στην δράση της αγγειοτενσίνης II. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη II ήταν σε θέση να προωθήσει το πολλαπλασιασμό των HepG2 κυττάρων με βελτίωση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής λειτουργίας και αυξάνοντας τα επίπεδα των ROS. Η περίσσεια των ROS από τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οδηγεί σε απόπτωση. Η σελαστρόλη λοιπόν ενισχύει με την δράση της την παραγωγή των ROS προκαλώντας κυτταρική απόπτωση μέσω αναστολής της μιτοχονδριακής λειτουργίας(23).

Ερευνητές επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι η σελαστρόλη θα μπορούσε να αναστείλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό με χρονοεξαρτώμενο και δόσοεξαρτώμενο τρόπο επάγοντας την απόπτωση και διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M. Στη συγκεκριμένη έρευνα ενδιαφέρον προκαλεί το ότι βρέθηκε πως η όλη κυτταροτοξική δράση της σελαστρόλης ενάντια στα κύτταρα HepG2 θα μπορούσε να ενισχυθεί από την συνεργασία της σελαστρόλη με νανοσωματίδια  $TiO_2$  (24).

### **2.3.5. Βιολογικές Δράσεις Αλισόλης B**

Η αλισόλη B είναι μια σημαντική ένωση που έχει απομονωθεί από το φυτό *Alismatis Rzizoma* και έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ενάντια σε ουρολογικές λοιμώξεις στη κινέζικη ιατρική (25). Σε μελέτες που έγιναν φαίνεται ότι ενισχύει την αυτοφαγία. Προκαλεί αύξηση της αυτοφαγικής ροής σε πολλές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από διαφορετικούς τύπους καρκίνου με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και το κυτταρικό θάνατο (26). Η αλισόλη προκαλεί αυτοφαγία μέσω της κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού  $CaMKK - AMPK - mTOR$ . Η διαταραχή της ομοιόστασης που προκαλείται στα κύτταρα με τη δράση της ένωσης, επάγει το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την εξάπλωση πρωτεϊνών επάγοντας το κυτταρικό θάνατο (26).

Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι αναστέλλει το πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυτταρικών σειρών των ωοθηκών μπλοκάροντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Ανάμεσα στις αντικαρκινικές τις δράσεις έρχεται να προστεθεί και η ικανότητα για αναστολή πολλαπλασιασμού σε καρκινική κυτταρική σειρά SGZ 7901 του γαστρικού καρκινώματος και επαγωγή απόπτωσης με αναστολή του μονοπατιού  $PI3K / Akt$ . Η επίδραση της στα κύτταρα SGC 7901 γίνεται με δόσοεξαρτώμενο αλλά και χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον κατά τη διάρκεια της δράσης της, στα κύτταρα αυτά παρατηρείται πυρηνικός κατακερματισμός, συμπύκνωση χρωμοσωμάτων, συρρίκνωση κυττάρων και σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων (27,25).

Ταυτόχρονα φαίνεται ότι η ένωση αυτή είναι δραστική και σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη όπως η κυτταρική σειρά PC - 3, στην κυτταρική σειρά HT 1080 του ανθρώπινου ινοκαρκινώματος και στην κυτταρική σειρά B 16 PIO μελανώματος σε ποντίκια (28). Η αλισόλη B μπορεί να αναστέλλει το πολλαπλασιασμό και να επάγει την απόπτωση σε λευχαιμία, και επίσης διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση και έχει προταθεί για χρήση στην ανάπτυξη φαρμάκων για τη πρόληψη παθολογικών αλλαγών που συνοδεύονται από

αθηροσκλήρωση. Συνεπώς υπάρχει η δυνατότητα για χρήση της σε θεραπεία σε ασθένειες όπως είναι το Alzheimer και βαριές μυοπάθειες (28).

Όσον αφορά στις αντιικές ιδιότητες αναφέρθηκε ότι έχει προστατευτική δράση ενάντια σε ιογενείς λοιμώξεις της ηπατίτιδας Β αλλά και ανασταλτική επίδραση ενάντια στον ιό HIV (28). Στην πληθώρα δυνατοτήτων της αλυσόλης συμπεριλαμβάνεται και η αντιαλλεργική δράση καθώς διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι μπορεί να αναστέλλει την άμεση αλλά και την έμμεση αλλεργική αντίδραση (29).

### **Αλυσόλη και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα**

Μια πολύ σημαντική ανακάλυψη είναι ότι η αλυσόλη Β βρέθηκε ότι μπορεί να αναστρέψει την ανθεκτικότητα σε ορισμένες κυτταρικές σειρές σε πολλά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε κλινικές θεραπείες. Έτσι το γεγονός ότι η αλυσόλη Β προκαλεί επαναφορά της ευαισθησίας σε κύτταρα HepG2 δείχνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή ηπατοπροστασίας (28).

## **ΣΤΟΧΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Η παρούσα εργασία εστιάστηκε στη μελέτη της δράσης καθαρών τριτερπενοειδών ουσιών στην ανάπτυξη ανθρωπίνων ηπατικών καρκινικών κυττάρων (HepG2). Μελετήθηκε η επίδραση των ενώσεων σελαστρόλη, αλισόλη Β, ολεανολικό οξύ και τρία επιλεγμένα ημισυνθετικά παράγωγα του ολεανολικού οξέος.



## **Β.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1.ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

#### **Θρεπτικό υλικό / DMEM**

Χρησιμοποιήθηκε για όλες τις καλλιέργειες και η σύσταση του είναι :

- 4,5 g/L D – Γλυκόζη,
- 4 mM L- Γλουταμίνη,
- 10 mg/L Πυροσταφιλικό οξύ

Το πλήρες θρεπτικό υλικό εμπλουτίζεται με 10% (όγκο κατ'όγκον) εμβρυικό βόειο ορό FBS και με αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη)

#### **PBS Phosphate Buffered Saline, 1X, 500 mL**

Είναι ένα διάλυμα φωσφορικών αλάτων με την ακόλουθη σύσταση.

- ✓ 137 mmol/L NaCl
- ✓ 2,7 mmol/L KCl
- ✓ 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ✓ 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Το διάλυμα έχει pH:7,4 και δεν περιέχει MgCl<sub>2</sub> και CaCl<sub>2</sub>. Έχει πολλές χρήσεις καθώς είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα. Διατηρεί τη ζωτικότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, κρατώντας το pH και την οσμωμοριακότητα σε φυσιολογικά επίπεδα. Χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας καλλιέργειας, για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού πριν από την επώαση με την θρυψίνη, καθώς η παρουσία του ορού λειτουργεί ανασταλτικά στην δράση της θρυψίνης.

#### **Διάλυμα θρυψίνης 5 % (10X) σε EDTA (0,5 % trypsin- EDTA)**

Το διάλυμα περιέχει 5000 mg/L θρυψίνη, 2000 mg/L sodium EDTA (Na<sub>2</sub> – EDTA) και 8500 mg/L χλωριούχο νάτριο (NaCl). Η θρυψίνη προμηθεύεται ως συγκεντρωμένο διάλυμα 10X και αραιώνεται σε διάλυμα PBS σε τελική συγκέντρωση 1X. Στη συνέχεια, δημιουργούνται aliquots τα οποία και διατηρούνται στους -20° C.

Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο επιτυγχάνει με την ενζυμική του δράση να διασπά τους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων και του υποστρώματος επιτυγχάνοντας την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα αλλά και τη διάσπαση των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων. Συγκεκριμένα, διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης.

Συνεπώς με τη χρήση της θρυψίνης επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας.

### **FBS (Fetal Bovine Serum, εμβρυϊκός βόειος ορός)**

Παρέχει στα κύτταρα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τους παράγοντες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν, να πολλαπλασιαστούν και να διαιρεθούν. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10% (όγκο κατ'όγκον) στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

### **Διαλύματα αντιβιοτικών στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης**

Τα αντιβιοτικά αυτά χρησιμοποιούνται με σκοπό τη πρόληψη των κύτταρων της καλλιέργειας από πιθανές βακτηριακές μολύνσεις. Τα αντιβιοτικά διατίθενται σε διάλυμα 100X αλλά η τελική συγκέντρωση (1X) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είναι 10,0units/mL πενικιλίνης και 10,0 μg/mL στρεπτομυκίνης.

### **DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο - χημικό τύπο $(CH_3)_2SO$ )**

Χρησιμοποιείται στο διάλυμα παγώματος (freezing medium), σε τελική συγκέντρωση 10% (όγκο κατ'όγκο). Είναι μια κρυοπροστατευτική ουσία που χρησιμοποιείται για την αποφυγή του σχηματισμού κρυσταλλών στο εσωτερικό των κυττάρων. Αν σχηματιστούν κρυσταλλοί μπορεί να προκληθούν βλάβες στις μεμβράνες των κύτταρων.

### **Αντιδραστήριο XTT Cell Proliferation Kit II**

Είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη ποσοτικοποίηση της επιβίωσης των κύτταρων.

## **2.ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ**

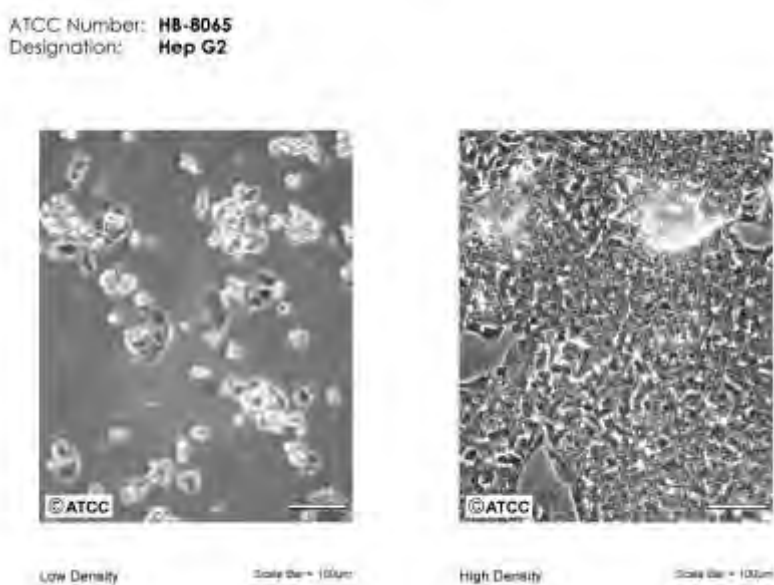
Οι φυτικές ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η σελαστρόλη, η αλίσόλη β, το ολεανολικό οξύ και 3 συνθετικά παράγωγά του εμπλουτισμένες με DMSO.

### **3.ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2**

Η κυτταρική σειρά HepG2 αποτελείται από ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος, τα οποία προέρχονται από ιστό ήπατος ενός 15 χρόνου άνδρα λευκού που έπασχε από καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Στην εποχή μας το ηπατικό καρκίνωμα αποτελεί την 5<sup>η</sup> πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως. Τα κύτταρα αυτά έχουν μορφή επιθηλιακών κυττάρων, μεγέθους 18  $\mu\text{m}$  και μπορούν να καλλιεργηθούν με μεγάλη επιτυχία σε ευρεία κλίμακα.

Τα κύτταρα HepG2 προσκολλούνται στην επιφάνεια καλλιέργειας και αναπτύσσονται υπό τη μορφή μικρών συσσωματωμάτων. Επιπλέον εκκρίνουν σημαντικές πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, πλασμινογόνο και ινωδογόνο. Όταν καλλιεργηθούν σωστά διαφοροποιούνται και αυτή η διαφοροποίηση μας δίνει την ικανότητα να μελετήσουμε τη δυσλειτουργία του ήπατος που μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες αλλά και την ενδοκυτταρική μεταφορά μορίων μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων του ήπατος. Χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τη μελέτη του μεταβολισμού του ήπατος και της τοξικότητας ξενοβιοτών αλλά και της ογκογένεσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες με συσκευές τεχνητού ήπατος.

(30,41,42)



Εικόνα 8: HepG2 κύτταρα ( από: <https://www.lgcstandards-atcc.org/> )

#### **4.ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37° C και 5% CO<sub>2</sub>. Η συντήρηση των κύτταρων σε καλλιέργεια γίνεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό που αποτελείται από θρεπτικό υλικό DMEM μέσα στο οποίο προστίθεται 10% FBS (όγκο κατ' όγκον) για την προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη για την αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων. Το πλήρες θρεπτικό υλικό διατηρείται σε ψυγείο και πριν από τη χρήση του προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο με 37° C.

Επιπλέον ο οποιοσδήποτε χειρισμός γίνεται στα κύτταρα πρέπει να γίνεται σε κάτω από άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (της εταιρείας TELSTAR) για να αποφευχθούν επιμολύνσεις. Για περισσότερη ασφάλεια στους χειρισμούς ο πάγκος εργασίας και όλα τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται ψεκάζονται με διάλυμα αιθανόλης 70%.

#### **5.ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HepG2**

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα με σκοπό την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων αλλά και την απόκτηση ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες πλήρως αποστειρωμένες 25 mm<sup>2</sup> (T<sub>25</sub>) και 75mm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub>).

Η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (εταιρείας KRUSS) που αναπτύσσονται στη φλάσκα δείχνει το πότε πρέπει να γίνει η ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Τα κύτταρα HepG2 καθώς αναπτύσσονται προσκολλώνται στην επιφάνεια της φλάσκας. Με το πέρας των ημερών και την κατανάλωση του θρεπτικού μέσου παρατηρείται συσσώρευση των κυττάρων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός τους καθώς τα κύτταρα δημιουργούν πολύστιβες δομές, όπου τα καινούργια κύτταρα αναπτύσσονται επί των προηγούμενων.

Η ανακαλλιέργεια γίνεται όταν το 70 – 80% περίπου της φλάσκας έχει καλυφθεί με τα κύτταρα, γιατί τότε δεν έχουν χώρο να μεγαλώσουν περισσότερο και η επαφή μεταξύ τους προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης τους. Ένα επιπρόσθετο σημάδι ότι τα κύτταρα είναι έτοιμα για ανακαλλιέργεια είναι η αλλαγή στο χρώμα του θρεπτικού υλικού εξαιτίας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (από πορτοκαλοκόκκινο γίνεται κιτρινωπό).

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων και το πέραςμα τους σε νέα φλάσκα απαιτείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης, δηλαδή επώαση των κυττάρων με το ένζυμο θρυψίνη. Η θρυψινοποίηση λαμβάνει χώρα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής υπό άσηπτες συνθήκες. Στη συνέχεια περιγράφεται η πορεία που ακολουθείται για φλάσκα T<sub>25</sub>.

Αρχικά πραγματοποιείται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού με αποστειρωμένη γυάλινη πιπέτα Pasteur που είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού. Ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα PBS. Συγκεκριμένα προστίθενται 4 ml από το διάλυμα PBS μέσα στη φλάσκα γίνεται ανακίνηση ελαφρώς και απομάκρυνση του διαλύματος. Η χρήση του διαλύματος PBS αποσκοπεί στην απομάκρυνση όλων των υπολειμμάτων του ορού που περιέχεται στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, καθώς ο ορός απενεργοποιεί το ένζυμο θρυψίνη.

Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος θρυψίνης, ενδεικτικά 800μl του διαλύματος, ελαφρά ανακίνηση ώστε το διάλυμα θρυψίνης να καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας και επώαση σε επωαστικό κλίβανο με 37°C και 5%CO<sub>2</sub> για 2 λεπτά με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων. Επιπλέον μπορούμε να διευκολύνουμε την αποκόλληση των κυττάρων χτυπώντας τη φλάσκα και αναδεύοντας με τη χρήση πιπέτας ώστε να επιτύχουμε όσο το δυνατό καλύτερη διάλυση των κυτταρικών συσσωματωμάτων.

Στη συνέχεια προστίθενται 3 - 4ml πλήρες θρεπτικού μέσου, ώστε ο ορός που περιέχεται σε αυτό να αναστείλει την περαιτέρω δράση της θρυψίνης. Τα κύτταρα στο στάδιο αυτό μεταφέρονται από τη φλάσκα καλλιέργειας σε σωληνάριο falcon χωρητικότητας 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1000 στροφές για 5 λεπτά με σκοπό την καθίζηση των κυττάρων, τα οποία μπορούν να επαναδιαλυθούν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, σε συνολικό όγκο 5ml. Μια ποσότητα από το κυτταρικό εναιώρημα (ποικίλλει ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος) μπορεί να μεταφερθεί σε νέα φλάσκα καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό μέσο. Οι φλάσκες καλλιέργειας διατηρούνται στον επωαστικό κλίβανο (σε θερμοκρασία 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε ανακαλλιέργεια πρέπει να αναγράφεται στη φλάσκα η ημερομηνία και ο αριθμός του περάσματος. Στον πίνακα 5 δίνονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία ανακαλλιέργειας κυττάρων σε φλάσκες T<sub>25</sub> και T<sub>75</sub>

Πίνακας 4: Τιμές όγκου για φλάσκες T<sub>25</sub> και T<sub>75</sub>.

	T <sub>25</sub>	T <sub>75</sub>
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ</b>	5 ml	15 ml
<b>ΘΡΥΨΙΝΗ</b>	800 μl	1.5 ml
<b>PBS</b>	4 ml	8 -10 ml

## **6.ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΚΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Για τη μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων εκτός καλλιέργειας γίνεται ψύξη τους με το υλικό παγώματος. Με τη ψύξη – πάγωμα τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  για μερικούς μήνες (από 3 έως 6 μήνες) αλλά και σε δοχείο υγρού αζώτου για περισσότερο χρονικό διάστημα.

Το υλικό παγώματος που χρησιμοποιείται αποτελείται από 10% DMSO (όγκο κατ'όγκον) είτε σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή σε FBS. Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό και αποτρέπει ουσιαστικά τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικού του κύτταρου και αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης των κυττάρων.

Για την επιτυχή διατήρηση των κυττάρων είναι πολύ σημαντικό να βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση πριν από την ψύξη τους. Έτσι λοιπόν η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται όταν καλυφθεί λιγότερο από το 70 – 80% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας

### **6.1 Πάγωμα Κυττάρων**

Η διαδικασία που ακολουθείται για το πάγωμα των κυττάρων που μεγαλώνουν σε μια φλάσκα καλλιέργειας  $T_{25}$  είναι η εξής:

Μετά την αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα με γυάλινη πιπέτα Pasteur συνδεδεμένη με αντλία κενού γίνεται ξέπλυμα των κυττάρων με 4 ml διαλύματος PBS. Στην συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 800μl θρυψίνης, ομαλή ανακίνηση και επώαση σε επωαστικό κλίβανο σε  $37^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$  για 2 περίπου λεπτά για καλύτερη αποκόλληση των κυττάρων και ήπια ανάδευση με πιπέτα. Προστίθεται πλήρες θρεπτικό υλικό (που περιέχει ορό και απενεργοποιείται η θρυψίνη) και τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon και φυγοκεντρώνται στις 1000 στροφές για 5 λεπτά.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται με αναρρόφηση και το ίζημα επαναδιαλύεται σε υλικό παγώματος και μεταφέρεται σε ένα cryovial. Τα κύτταρα τέλος ψύχονται σταδιακά γι' αυτό και αρχικά μεταφέρονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για λίγες ώρες και ακολούθως στους  $-80^{\circ}\text{C}$  προκειμένου να επιτευχθεί η ομαλή ψύξη τους, αρά και μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης τους. Σε κάθε cryovial σημειώνεται ο κυτταρικός τύπος, ο αριθμός του περάσματος και η ημερομηνία ψύξης των κυττάρων.

### **6.2 Απόψυξη – Ξεπάγωμα κύτταρων**

Το ξεπάγωμα των κυττάρων πρέπει να γίνεται γρήγορα ώστε να διασφαλιστεί η μεγαλύτερη επιβίωση των κυττάρων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Τα κύτταρα μεταφέρονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  ή το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$  και ανακινώνται με ταχείς κινήσεις για 1 με 2 λεπτά μέχρι να ξεπαγώσουν πλήρως. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου falcon στο οποίο περιέχονται 4ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά, η οποία στοχεύει στην απομάκρυνση του κρυοπροστατευτικού DMSO που είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά από την απομάκρυνση του υπερκείμενου το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (συνολικού όγκου 5ml) και μεταφέρεται σε φλάσκα τύπου T<sub>25</sub>. Τα κύτταρα αφήνονται να προσκολληθούν στη φλάσκα καλλιέργειας και να αναπτυχθούν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>.

## **7.ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟΥ**

Για την επιτυχή εκτέλεση των πειραμάτων απαιτείται η χρήση ενός συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου ή αλλιώς της πλάκας neubaehr.

Η πλάκα αυτή είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα με δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε επιφάνεια έχει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα. Κάθε κύριο τετράγωνο ορίζεται από 3 παράλληλες γραμμές οι οποίες χρησιμοποιούνται για να καθοριστεί αν τα κύτταρα βρίσκονται εντός ή εκτός του πλέγματος. Ακόμη κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να βοηθήσει στη μέτρηση των κυττάρων.

Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0,1mm χαμηλότερα από τις "ράχες" στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα σε ποσότητα 10μl.

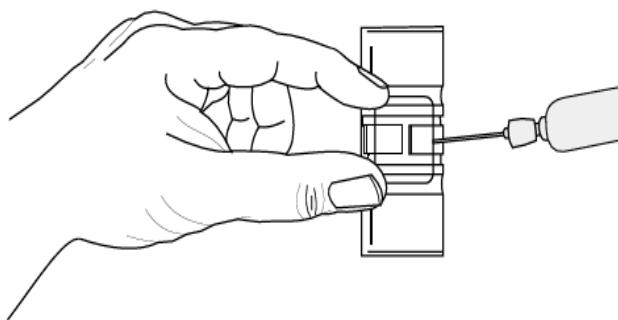
Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μέτρηση των κυττάρων που μεγαλώνουν σε φλάσκα T<sub>25</sub> είναι η εξής:

Απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τη φλάσκα καλλιέργειας, τα κύτταρα ξεπλένονται 4ml PBS, προστίθενται 800μl διαλύματος θρυψίνης και ακολουθεί επώαση για 1-2 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C και 5%CO<sub>2</sub> για να αποκολληθούν τα κύτταρα. Μετά από την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου και ανάδευση των κυττάρων, το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σωληνάριο falcon και φυγοκεντρείται 1000 στροφές για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό υλικό.

Μια ποσότητα 10μl από το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται στο αιμοκυτταρόμετρο, και παρατηρείται στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων.



Εικόνα 9: Αιμοκυτταρόμετρο ( από: [www.microbehunter.com](http://www.microbehunter.com))



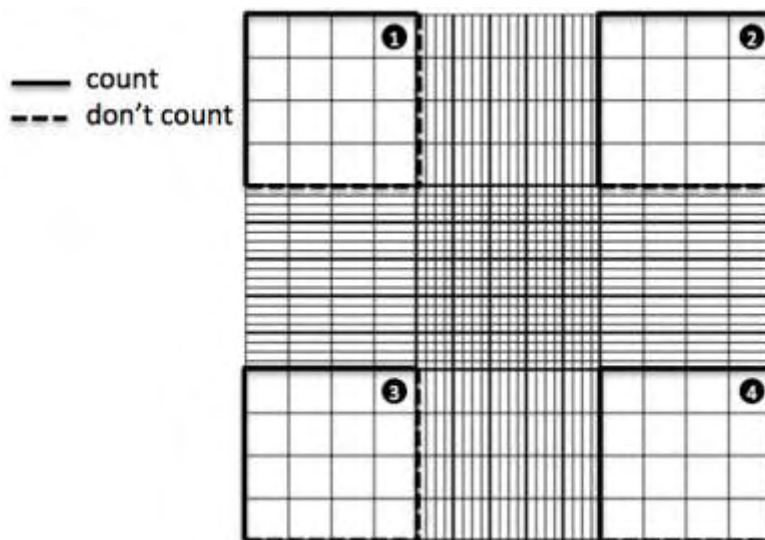
Εικόνα 10: Προσθήκη εναιωρήματος κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο ( από: [www.hepatocytometer.org](http://www.hepatocytometer.org) )

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα τα οποία στους υπολογισμούς χαρακτηρίζονται ως Α, Β, Γ και Δ. Εκτός από τα κύτταρα που βρίσκονται στα τετράγωνα αυτά μετρώνται και τα κύτταρα στις δύο εξωτερικές τους επιφάνειες.

Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (κύτταρα/ml) υπολογίζεται ως ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων στα 4 τετράγωνα πολλαπλασιασμένο με το  $10^4$  σύμφωνα με το τύπο που ακολουθεί:

$$(A+B+Γ+Δ) / 4 * 10^4 \text{ κύτταρα/ml.}$$





Εικόνα 11: Μέτρηση αριθμού κύτταρων με το αιμοκυτταρόμετρο ( από: [www.hemocytometer.org](http://www.hemocytometer.org) )

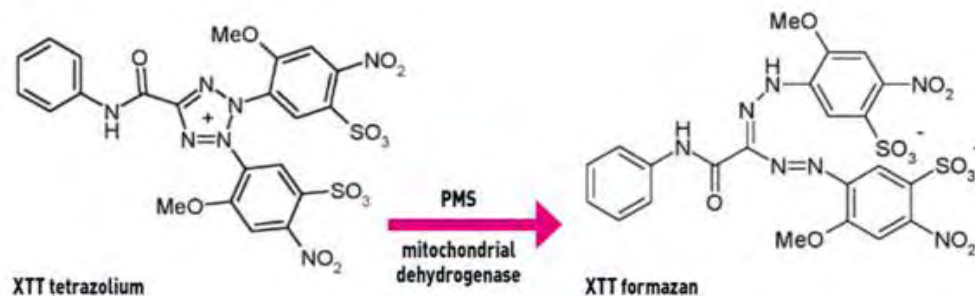
## **8.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΧΤΤ**

### **A) Αρχή της μεθόδου**

Τα άλατα τετραζολίου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως αντιδραστήρια σε μελέτες εντοπισμού και προσδιορισμού της κυτταρικής βιολογίας. Το ΧΤΤ είναι ένα είδος τετραζολικού άλατος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για το προσδιορισμό, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταροτοξικότητας και της απόπτωσης. Είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για τη μέτρηση της ανάπτυξης κυττάρων, τη ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας αλλά και για το προσδιορισμό της ευαισθησίας ενός φαρμάκου σε διάφορες καρκινικές σειρές.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διάσπαση του ΧΤΤ μίας άχρωμης ή ελαφρώς κίτρινης ουσίας και στη παραγωγή ενός προϊόντος με έντονο πορτοκαλί χρώμα της φορμαζάνης. Όταν τα εξεταζόμενα κύτταρα είναι ζωντανά, και άρα διαθέτουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα, το ΧΤΤ διασπάται και παρατηρείται αλλαγή του χρώματος λόγω της παρουσίας της φορμαζάνης.

Ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος γίνεται για το προσδιορισμό της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων και έμμεσα στο προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η τιμή της οπτικής πυκνότητας είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων.



Εικόνα 12: Αναγωγή αντιδραστηρίου XTT σε έγχρωμο προϊόν φορμαζάνη (από: [www.applichem.com](http://www.applichem.com))

Για την αύξηση της ευαισθησίας του αντιδραστηρίου XTT χρησιμοποιείται ένα άλλο αντιδραστήριο - το αντιδραστήριο σύζευξης ηλεκτρονίων ή ενεργοποίησης το PMS. Ένα αντιδραστήριο το οποίο μεσολαβεί μαζεύοντας όλα τα ηλεκτρόνια στην επιφάνεια του κύτταρου και δημιουργεί ένα αντιδραστικό ενδιάμεσο το οποίο στη συνέχεια θα βοηθήσει στη αναγωγή του XTT και στην εμφάνιση του έντονα χρωματισμένου πορτοκαλί προϊόντος της φορμαζάνης.

Η χρωστική φορμαζάνη μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα και με ακρίβεια μέσω ενός φασματοφωτόμετρου (ELISA reader), και έτσι είναι δυνατή η συλλογή ενός μεγάλου αριθμού δεδομένων που επεξεργάζονται με τη βοήθεια ενός υπολογιστή.

Η μέθοδος αυτή είναι ασφαλής καθώς δεν γίνεται χρήση ραδιενεργών ισότοπων. Επίσης είναι αρκετά γρήγορη και εύκολη στη χρήση μέθοδος. Χαρακτηρίζεται από ακρίβεια αφού δίνεται άμεσα ο αριθμός των κυττάρων, αλλά και από ευαισθησία καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και μικρό αριθμό κυττάρων (31,32).

## **Β) Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της κυτταρικής ανάπτυξης με τη μέθοδο XTT**

Η πειραματική διαδικασία διαρκεί 4 ημέρες. Την πρώτη μέρα τα κύτταρα αποκολλούνται από τις φλάσκες καλλιέργειας με τη επίδραση της θρυψίνης, μετρώνται με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου και υπολογίζεται ο όγκος στον οποίο περιέχονται 30,000 κύτταρα τα οποία θα τοποθετηθούν ανά πηγαδάκι (well) σε τρυβλίο των 96 θέσεων (96 - well plate). Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (παρουσία αντιβιοτικών και ορού) και επωάζονται για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO<sub>2</sub> ώστε να προσκολληθούν ομοιόμορφα στο τρυβλίο.

Την δεύτερη ημέρα απομακρύνεται το πλήρες θρεπτικό υλικό και προστίθενται οι υπό εξέταση ενώσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις (σε θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικών και απουσία ορού) σε τελικό όγκο 100μl. Η κάθε ένωση προστίθεται τουλάχιστο σε δύο πηγαδάκια (duplicates). Σε κάθε πείραμα περιέχει και κύτταρα ελέγχου (control), τα οποία είναι κύτταρα που επωάζονται με θρεπτικό υλικό με αντιβιοτικά και απουσία ορού και ενώσεων, παρουσία του DMSO, που αποτελεί τον διαλύτη των ενώσεων. Εν συνεχεία τα κύτταρα επωάζονται για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37° C και 5%CO<sub>2</sub> .

Την τέταρτη ημέρα, πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Προστίθεται το αντιδραστήριο ΧΤΤ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά για την προετοιμασία του αντιδραστήριου ΧΤΤ χρησιμοποιούνται δύο αντιδραστήρια, τα Α και Β. Το αντιδραστήριο Α είναι το ΧΤΤ - labeling reagent και το αντιδραστήριο Β είναι το electron- coupling reagent, PMS. Αφού ξεπαγώσουν τα δύο αντιδραστήρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Παρασκευάζεται ένα μείγμα που περιέχει 50μl από το αντιδραστήριο Α και 1μl από το αντιδραστήριο Β. Ακολούθως προστίθενται 50μl από το μίγμα σε κάθε πηγαδάκι, και αναμειγνύεται με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή του. Το τρυβλίο επωάζεται σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37° C και 5% CO<sub>2</sub> για 4 ώρες.

Ακολούθως γίνεται φωτομέτρηση στα 450nm και στα 630nm που χρησιμοποιείται ως μήκος κύματος αναφοράς. Η φωτομέτρηση γίνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου ELISA plate reader και με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Gen5.

### **B1. Επεξεργασία και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης μεταφέρονται σε αρχείο excel και αναλύονται. Οι απορροφήσεις στα δύο μήκη κύματος χρησιμοποιούνται για το προσδιορισμό του ποσοστού αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης που προκαλείται από την κάθε ένωση σε σχέση με κύτταρα ελέγχου, με βάση τον τύπο (31,32).

**% Αναστολή = OD Δείγμα Ελέγχου – OD Δείγματος / OD Δείγμα Ελέγχου \*100** όπου:

OD Δείγμα Ελέγχου → ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων ελέγχου, που υπολογίζεται από την αφαίρεση για κάθε well από την αφαίρεση της απορρόφησης των 630nm από τη απορρόφηση των 450nm σε δείγματα που περιέχουν κύτταρα απουσία ενώσεων.

OD Δείγματος → ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του εξεταζόμενου δείγματος, που υπολογίζεται από την αφαίρεση της απορρόφησης των 630nm από την απορρόφηση στα 450nm σε κύτταρα τα οποία επωάζονται με τις υπό εξέταση ενώσεις.

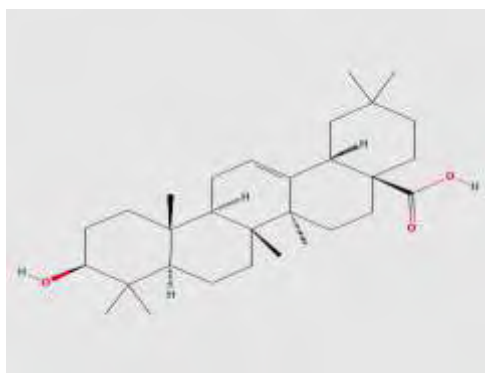
Στη συνέχεια, τα % ποσοστά αναστολής των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου (control) χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική ανάλυση, με τη βοήθεια της μεθόδου Student's t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent Student's t-test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στα 0.05.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

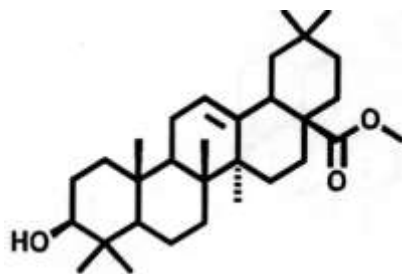
### **Μελέτη της επίδρασης τριτερπενικών ενώσεων στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων**

Μελετήθηκε η δράση των εξής τριτερπενικών ενώσεων στην ανάπτυξη των κυττάρων HepG2: ολεανολικό οξύ (oleanolic acid) και τρία συνθετικά παράγωγα του, η σελαστρόλη (celastrol) και η αλίσόλη Β (alisol B). Όλες οι ενώσεις εξετάστηκαν αρχικά στη συγκέντρωση των 25μΜ.

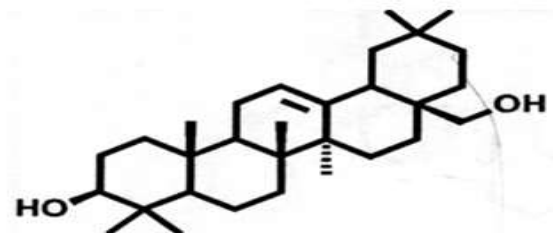
Το ολεανολικό οξύ (Εικόνα 13) παρουσίασε μικρή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, σε ποσοστό περίπου 16%, εν αντιθέσει με τα παράγωγα του τα οποία δεν δρουν ενάντια στα κύτταρα HepG2. Αντίθετα, τα παράγωγα του ολεανολικού οξέος #1 (Εικόνα 14), #2 (Εικόνα 15) και #3 (Εικόνα 16) δεν εμφάνισαν δραστικότητα αφού η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης που προκάλεσαν δεν ήταν στατιστικά σημαντική (τα ποσοστά αναστολής σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου ήταν 0.54%, 1.15%, 6.4% αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο γράφημα 1.



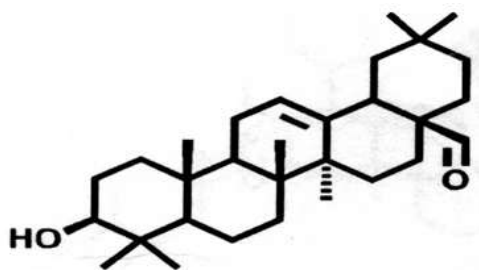
Εικόνα 13: Δομή ολεανολικού οξέος



Εικόνα 14: Δομή παραγώγου#1 ολεανολικού οξέος

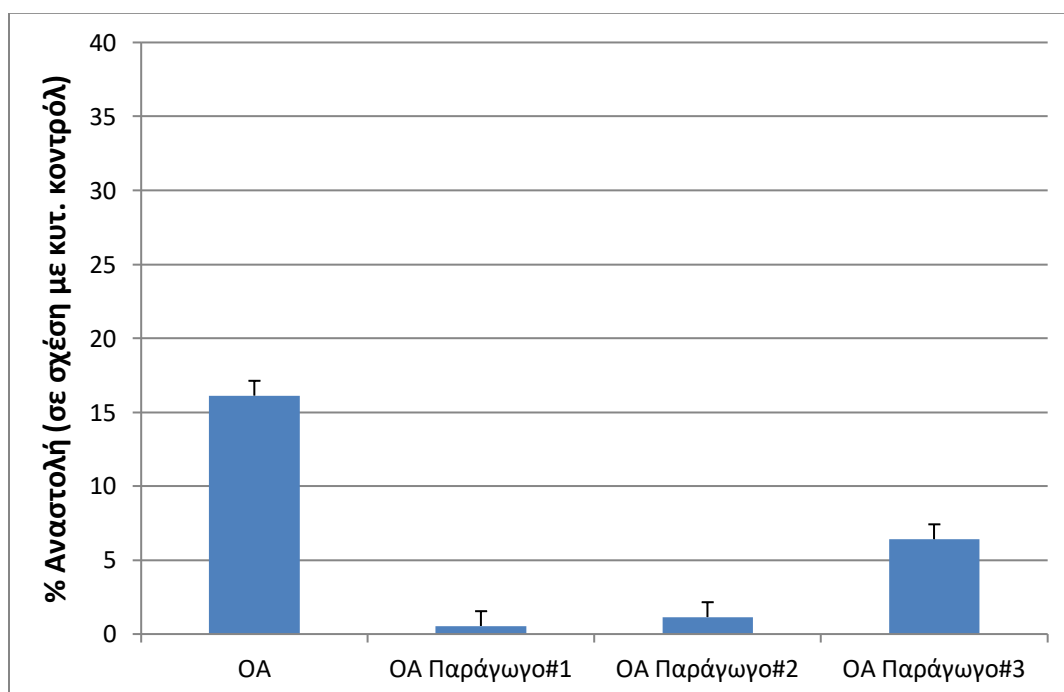


Εικόνα 15: Δομή παραγώγου#2 ολεναολικού οξέος



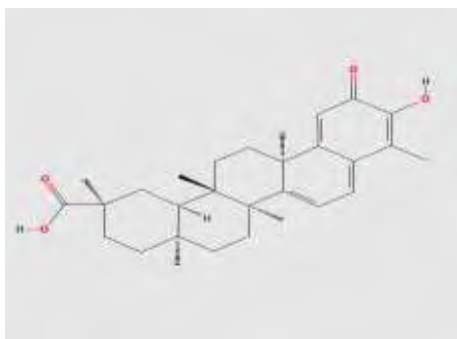
Εικόνα 16: Δομή παραγώγου#3 ολεανολικού οξέος

**Γράφημα 1:** Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από το ολεανολικό οξύ και τα παράγωγά του, σε συγκέντρωση 25μM.



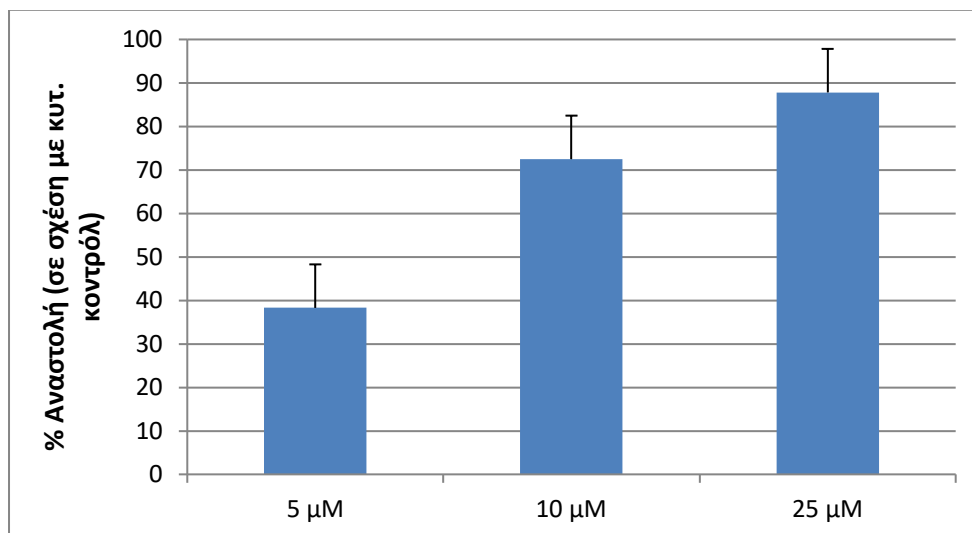
Οι τροποποιήσεις που έγιναν στη δομή του ολεανολικού οξέος για το σχηματισμό των τριών συνθετικών παραγώγων του, ήταν αλλαγές στον τελευταίο δακτύλιο του ολεανολικού οξέος και αφορούσαν την διαγραφή ενός H από την πλευρική αλυσίδα COOH, ή απαλοιφή του διπλού δεσμού και αφαίρεση του OH. Οι τροποποιήσεις δεν ήταν αποτελεσματικές έναντι των κυττάρων HepG2 καθώς το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις δεν βελτιώνουν την δραστικότητα της μητρικής ένωσης.

Η ένωση σελαστρόλη αφού προκάλεσε υψηλό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης της τάξης των 88.82% σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου σε συγκέντρωση 25μM, δοκιμάστηκε και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 10μM και 5μM. Σε συγκέντρωση 10μM το ποσοστό αναστολής που παρουσίασε ήταν επίσης αρκετά υψηλό, της τάξης του 72.47%, ενώ σε συγκέντρωση 5μM το ποσοστό μειώνεται στο 38.27%. Στην Εικόνα 17 δίνεται η δομή της σελαστρόλης και στο Γράφημα 2 παρουσιάζονται τα διαφορετικά ποσοστά αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

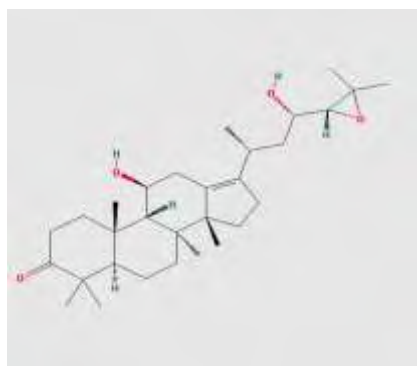


Εικόνα 17: Δομή σελαστρόλης

**Γράφημα 2:** Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης σελαστρόλης.

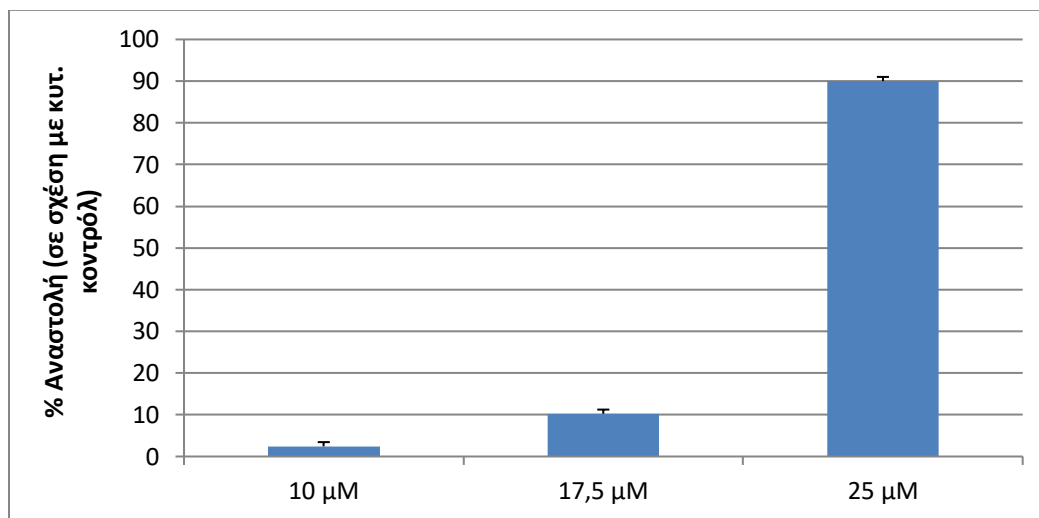


Παρόμοια αποτελέσματα με τη σελαστρόλη προέκυψαν και για την ένωση αλίσόλη Β η οποία προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου σε συγκέντρωση 25μM σε υψηλό ποσοστό, και για το λόγο αυτό μελετήθηκε περαιτέρω η επίδραση της σε μικρότερες συγκεντρώσεις των 10μM και των 17,5μM. Όπως φαίνεται στο γράφημα 3, σε συγκέντρωση 25μM το ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης ήταν εντυπωσιακά υψηλό καθώς, έφτασε το 90%, αλλά μειώνεται σημαντικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις, ενδεικτικά εκτιμάται σε 2.5% και 10% σε συγκεντρώσεις 10μM και 17,5μM αντίστοιχα. Η δομή της αλίσόλης Β φαίνεται στην εικόνα18.



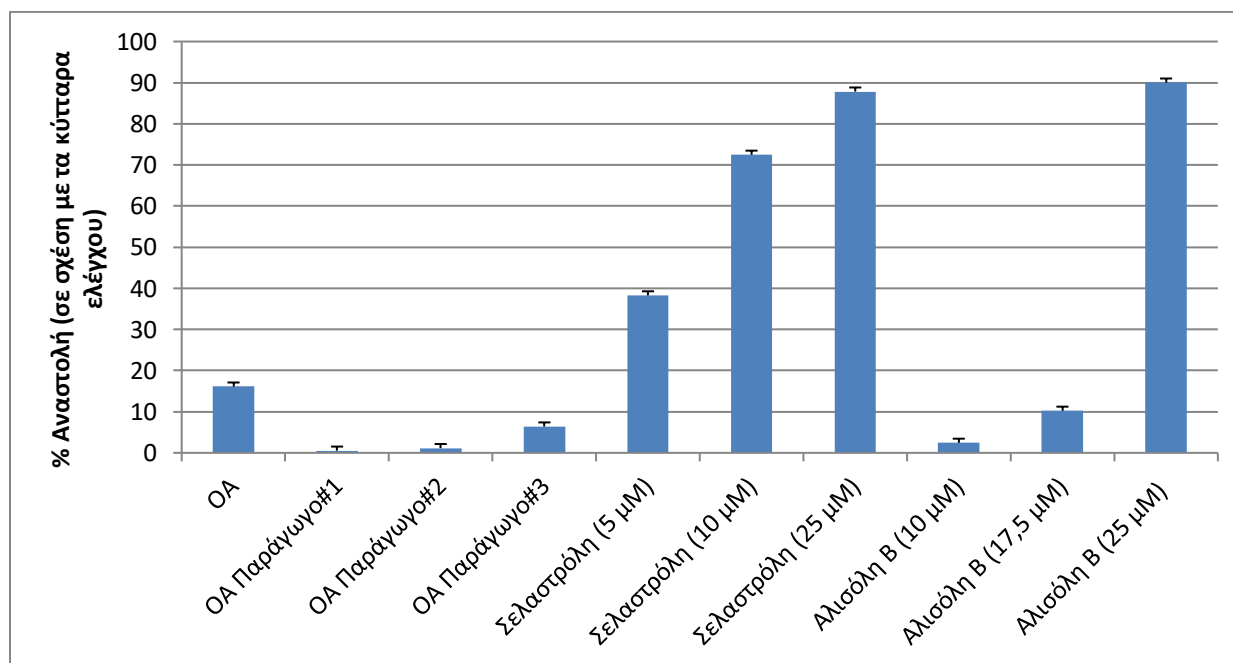
Εικόνα 18: Δομή αλίσόλης Β

**Γράφημα 3:** Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από διαφορετικές συγκεντρώσεις της αλισόλη B.



Στο γράφημα 4 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της αναστολής που προκαλεί η κάθε ένωση σε κύτταρα HepG2.

**Γράφημα 4:** Επί τις εκατό ποσοστό αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου από τις ενώσεις που εξετάστηκαν.





## **Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το ολεανολικό οξύ παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση έναντι των κυττάρων HepG2. Συγκεκριμένα, η επίδραση του ολεανολικού οξέος σε συγκέντρωση 25μM προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επαγωγή απόπτωσης και κατακερματισμό του DNA, σε ποσοστό 31,7% (16). Είναι επίσης γνωστό ότι κάποιες τροποποιήσεις στη δομή του ολεανολικού οξέος μπορούν να αυξήσουν τη δραστηριότητα της μητρικής ένωσης (11). Εν τούτοις οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν προκάλεσαν αύξηση της κυτταροτοξικότητας.

Με βάση τη βιβλιογραφία η ένωση σελαστρόλη μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με δόσοεξαρτώμενο τρόπο επάγοντας την απόπτωση και διακόπτοντας το κυτταρικό κύκλο (24). Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπου η κυτταροτοξική δράση της έναντι των κυττάρων HepG2 αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης όπως παρουσιάζεται και στο γράφημα 2.

Τέλος όσον αφορά την αλισόλη διάφορες έρευνες έχουν αποδείξει ότι μπορεί να δράσει κυτταροτοξικά ενάντια σε κύτταρα διαφόρων τύπων καρκίνου όπως καρκίνο των ωοθηκών, γαστρικό καρκίνωμα, καρκίνο προστάτη, ινοκαρκίνωμα και λευχαιμία (25, 26, 27). Η ικανότητα της αυτή επιβεβαιώθηκε και στα πειράματα αυτής της εργασίας, καθώς η αλισόλη B σε συγκέντρωση 25μM παρουσίασε υψηλό ποσοστό αναστολής (90%) της κυτταρικής ανάπτυξης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Τέλος έχει αναφερθεί και μια επιπλέον δράση της αλισόλης που αφορά το γεγονός ότι μπορεί να επαναφέρει την ευαισθησία των κυττάρων HepG2 σε διάφορα φάρμακα(28).

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. The Cell: A molecular Approach, 2<sup>nd</sup> edition, Cooper GM (2001), “ The Development and causes of cancer” , bookshelf ID: NBK 9963.
2. Luca Cicalese, John Sealy, “Hepatocellular Carcinoma”, Dec. 22, 2016.
3. Zhao – You Tang, “Hepatocellular Carcinoma – Cause, Treatment and Metastasis”, August 2001,ISSN 1007-9327.
4. Wojciech Blonski, David Skotlyar, Kimbely A Forde, “Non – viral causes of hepatocellular carcinoma”, August 7, 2010, DOI: 10.3748/wjg.v16.i29.3603.
5. Ryota Masuzaki, Masao Omata, “Treatment of hepatocellular carcinoma”, 2008 May – June;27: 113 – 122.
6. Rainer Breiting, Ana Cecineros, Andris Jankevics and Eriko Takano, “Metaboleomics for secondary Metabolite Research”, 2013,3,1076 – 1083, doi: 103390/metabo 3041076.
7. Douglas J.Mc Garrey and Rodney Croteau, “Terpenoid Metabolism”, The plant cell, vol7,1015 – 1020, July 1995.
8. Petr Dzubak, Marian Hajduch, David Vydra, Alica Hustova, Miroslav Kvensica, David Biedermann, Lenka Markova, Milan Urban and Jan Sarek, “Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications”, 3<sup>rd</sup> May 2006, doi: 10.1039/b515312n.
9. Milan Urban, Miroslav Kvensica, Niall J.Dickinson and Jan Sarek, “Biologically active Triterpenoids usable as prodrugs”, 2008.
10. Miroslav Kvensica, Milan Urban, Niall J.Dickinson and Jan Sarek, “Pentacyclic Triterpenoids with nitrogen – and sulfur – containing heterocycles: synthesis and medicinal significance”, 4<sup>th</sup> February 2015, doi: 10.1039/c5np00015.
11. Anupam Bishayee, Shamina Ahmed, Nikoleta Brankov and Marjorie Derloff, “Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer”, 2011 March 15.
12. Malwin Chudzik, Ilona Korzone K- Szlacheta and Wojich Krol, “Triterpenes as potentially cytotoxic compounds”, 2015,20,1610 – 1625;doi: 103390/molecules20011610.
13. Nayoung Han and Marica Bakovic, “Biologically Active Triterpenoids and Their cardioprotective and anti – Inflammatory Effects”, 2015, doi: 104172.
14. Jiri Patocka, “Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification”, 7-12,2013, ISSN 1214- 0287.
15. Nighat Sultana & Athar Ata, “Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds”, 20 Oct.2008, doi:10.1080/14756360701633187.
16. Yue – Yong Zhu, Hong – Yan Huang and Yin – Lian Wu, “Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through the cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells”, 2015, doi: 10.3892.

17. Yan – yan Yan, Yan Guo, Wei Zhang, Cun – gen Ma, Yan – xia Zhang, Chen Wang, Hai – xia Wang, “ Celastrol enhanced the anticancer effect of lapatinib in human hepatocellular carcinoma cells in vitro”, IBUON 2014;19(2):412-418.
18. Paramaiyan Rajendran, Feng Li, Muthuk Shanmugam, Radhmani Kannaiyan, Jen Nee Goh, Kwong Fai Wong, Wei Wang, Ester Khin, Vinay Jergaonkav, Alan Prem Kumar, John M.Luck and Gautom Sethi, “ Celastrol suppresses Growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma through the Modulation of STAT3/JAK2 signaling cascade in vitro and in vivo”, February 27, 2012, doi:10.115811940 – 6207.
19. Guozhu Chen, Xuhui Zhang, Ming Zhao, Yan Wang, Yiang Cheng, Di Wang, Yuanji Xu, Zhiyan Du and Xiaodan Yu, “celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species – dependent cytotoxicity in tumor cells”, BMC Cancer 2011, 11:170.
20. Jay Wolfrom, Krishna Suri, Yi Huang, Roberto Molinaro, Carlotta Borsoi, Bronwyn Scott, Kathryn Boom, Donatella Paolino, Massimo Fresta, Jianghua Wang, Mauro Ferrari, Christian Celia and Haifa Shen, “ Evaluation of anticancer activity of celastrol liposomes in prostate cancers cells”, J.Microencapsul. 2014, 31 (5): 501-507,doi:10.3109/02652048.2013.879932.
21. Radhamani Kannaiyan, Hui Sintlay, Peramaiyan Rajendran, Feng Li, Muthu K Shammugam, Shireen Vali, Taher Abbasi, Sheta Kapoor, Ashish Sharma, Alan Prem Kumar, Wee – Joo Chings and Gautam Sethi, “ celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down – regulation of Nf –  $\kappa$ B and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells”, doi:10.1111/j 1476 – 5381.2011.01449.
22. Milan Urban, Jan Sarek, Miroslav Kvasnica, Ira Tislerova and Marian Hajduch, “Triterpenoid Pyrazines and Benzopyrazines with cytotoxic activity”, September 6,2006, doi:10.1021/np060436d.
23. Liu Xi, Gao Rw, Li M, Si Cf, He Yp, Wang M, Yang Y, Zheng QY, Wang Cy, “The ROS derived mitochondrial respiration not from NADPH oxidase plays key role in celastrol against angiotensin II – mediated HepG2 cell proliferation”, 2016 Nov, doi: 10.1007/510495-016-1294-6.
24. Jinguan Li, Xuemei Wang, Hui Jiang, Xiaohua Lu, Yudan Zhu and Bacan Chen, “New strategy of photodynamic treatment of TiO<sub>2</sub> nanofibers combined with celastrol for HepG2 proliferation in vitro”, 10 Jun 2011, doi: 10.1039/c=C1NR10185D.
25. Yong – Hong Xu, Li – Jie Zhao and Yan Li, “Alisol B acetate induces apoptosis of SGC7901 cells via mitochondrial and phosphatidylinositol 3 – kinase / Akt signaling pathways”, 2009 Jun 21, DOI: 10.3748/wjg 15.2870.
26. Betty Y.K.Law, Mingfu Wang, Dik – Lung Ma, Fawaz Al – Mousa, Francesco Michelongeli, Suk – Hang Chem, Chi – Ming Che, Pauline Chiu and Ben C.B.Ko, “Alisol B, a novel Inhibitor of the Sarcoplasmic / Endoplasmic Reticulum Ca<sup>+2</sup> ATPase Pump, Induces Autophagy, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis”, March 2010.
27. Le – Le Zhang, Yu – Lian Xu, Zheng – Hai Tang, XiaO – Huang Xu, Xin Chen, Ting Li, Chum – Yong Ding, Ming – Qing Huang, Xiu – Ping Chen, Yi – Tao Wang, XiaO – Feny

- Yuan, Jin – Jian Lu, “ Effect of alisol b 23 – acetate on ovarian cancer cells: G1 phase cell cycle arrest, apoptosis, migration and invasion inhibition”, 2016.
28. Ming Zhao, Tanja Godecke, Jordon Gunn, Jin – Au Duan and Chum – Tao Che, “Protostane and Fusidane. Triterpenes: A mini Review”, 2013, 18, 4054-4080,doi: 10.3390/molecules 18044054.
29. Je Hyeong Lee, Oh Sang Known, Hong – Guang Jin, Eun – Rhan Woo, Yeong Shik Kim and Hyun Pyo Kim, “The Rhizomes of *Alisma orientale* and Alisol Derivatives Inhibit Allergic Response and Experimental Atopic Dermatitis”, September 2012.
30. Dolores Lopez, Sau Wai, Milton J. Finegold, Barbara B, “doi:10.16/jhumpath.2009.07.03.
31. “Cell Proliferation Kit II( XTT)”, colorimetric assay ( XTT based) for the non – radioactive quantification of the cell proliferation and viability, cat.No 11.465.015.001, Version August 2005.
32. “XTT cell Proliferation Assay kit”, Instruction Manual, catalog number 30 – 1011K, ATCC.

Άλλες πηγές:

33. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) .
34. « Μηχανισμοί Ογκογένεσης», Κ.Ε. Σεκέρης.
35. «Μονοπάτια Καρκινογένεσης ( πολλαπλασιασμός, κυτταρικός κύκλος, αναδιπλασιασμός DNA, αθανатоποίηση, αντιαπόπτωση, αγγεογένεση, διήθηση μετάσταση)», Δρ.Γ.Δ.Κλούβας.
36. [www.cancerresearch.uk.org](http://www.cancerresearch.uk.org) .
37. [www.med.md.com](http://www.med.md.com) .
38. [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) .
39. [lifeplant.blogspot.gr](http://lifeplant.blogspot.gr) .
40. ESMO – European Society for Medical Oncology, [www.anticancerfund.org](http://www.anticancerfund.org) , [www.esmo.org](http://www.esmo.org) .
41. [www.celeromics.com](http://www.celeromics.com)
42. [www.hepg2.com](http://www.hepg2.com)