



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΚΑΡΑΓΚΙΝΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΦΥΤΑ ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΤΑ ΓΕΝΗ *PRUNUS*, *PYRACANTHA*, *PYRUS*, *ROSA*
ΚΑΙ *SANGUISORBA* ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ
(HepG2)



ΛΑΡΙΣΑ 2015

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΦΥΤΑ ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΤΑ ΓΕΝΗ *PRUNUS*, *PYRACANTHA*, *PYRUS*, *ROSA*
ΚΑΙ *SANGUISORBA* ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ
(HepG2)**

**STUDY OF THE EFFECT OF PLANT POLYPHENOLIC EXTRACTS OF
THE GENERA *PRUNUS*, *PYRACANTHA*, *PYRUS*, *ROSA* ΚΑΙ *SANGUISORBA*
ON THE GROWTH OF LIVER CANCER CELLS (HepG2)**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σέρκος Χαρουτουγιάν: Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

*Σε όλους αυτούς που με τον τρόπο τους
δεν εγκαταλείπουν τον αγώνα.*

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας με πρώτο τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, που μου επέτρεψε να εκπονήσω στο Εργαστήριο που διευθύνει μέσα σε ένα γόνιμο ακαδημαϊκό περιβάλλον.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον καθηγητή κ. Στάγκο Δημήτριο για την ευκαιρία που με έδωσε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου, καθώς και για την άριστη συνεργασία, υποστήριξη και κατανόηση που μου παρείχε, καθώς επίσης και τον Καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουγιάν για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της εργαστηριακής ομάδα και ιδιαίτερα τους κ. Αναστάσιο Μπέσιο, κ. Γερασόπουλο Κώστα, κ. Γκουτζουρέλα Νίκο, κ. Αλεξάνδρο Πρίφτη, κ. Σωτηρία Μακρή και κ. Ύπατιο Σπανίδη για τη βοήθειά, τη φιλία, τη συνεργασία και τη στήριξη τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την οικογένειά μου για την αγάπη και την αμέριστη ψυχική στήριξη που μου προσφέρει σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Ο καρκίνος είναι ένα από τα συχνότερα και σοβαρότερα νοσήματα που αντιμετωπίζει η κλινική ιατρική. Φαίνεται ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Η εκδήλωση του καρκίνου, (όρος που αναφέρεται σε 150-200 διαφορετικές παθήσεις), οφείλεται ως επί το πλείστον σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε κάποιο ποσοστό όμως έχει και γενετική βάση με την έννοια της προδιάθεσης ορισμένων ατόμων για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου.

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισής του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ανάμεσα στους κύριους χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες συγκαταλέγονται και οι πολυφαινόλες. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση 9 πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά που ανήκουν στα γένη των *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*, της οικογένειας *Rosaceae*, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG2). Σε πρώτη φάση, η εκτίμηση της δράσης τους έγινε με τη μέθοδο του XTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική, δοσοεξαρτώμενη, δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2, με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 42 (*Sanguisorba officinalis*) έως 315 μg/mL (*Prunus prostrata*), επιβεβαιώνοντας τον χαρακτηρισμό τους σαν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Στη δεύτερη φάση της μελέτης έγινε προσδιορισμός της πρόκλησης απόπτωσης από το ισχυρότερο υπό εξέταση εκχύλισμα (*Sanguisorba officinalis* στη συγκέντρωση IC₅₀=42 μg/ml) σε καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2), σε συνάρτηση με το χρόνο (0, 1, 4, 12 και 24 ώρες), με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Κατά τη διάρκεια εξέλιξης του φαινομένου, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώνεται από το αρχικό 83,3% επί του κυτταρικού πληθυσμού μάρτυρα σε 45,4%, 40,1%, 34,37%, 41,6% μετά από 1, 4, 12 και 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση στο ποσοστό των αποπτωτικών κύτταρων από το 7,4% του αρχικού πληθυσμού σε 30,6%, 39,3%, 39% και 41,5% έπειτα από αντίστοιχα 1, 4, 12 και 24 ώρες δράσης του εκχυλίσματος. Υπό τις ίδιες συνθήκες, το ποσοστό των προ-αποπτωτικών κυττάρων τροποποιείται από 10,27% επί του κυτταρικού πληθυσμού μάρτυρα σε 9,02%, 10,08%, 25,97% και 20,08% αντίστοιχα. Τέλος, το ποσοστό του νεκρωτικού πληθυσμού, αυξάνεται από 0,25% του συνόλου των κυττάρων του πληθυσμού μάρτυρα σε 3,43%, 6,45%, 7,13% και 7,13% μετά από επώαση για 1, 4, 12 και 24 ώρες με το εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν για πρώτη φορά, σημαντικές ενδείξεις για την αντικαρκινική και αντι-αποπτωτική ικανότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας *Rosaceae*.

Abstract

Nowadays, cancer is the second most deadly disease in the western world. Development of cancer (a general term that can refer to 150-200 different diseases) can be mainly triggered by environmental factors but it also has a genetic basis regarding the predisposition of individuals for specific types of tumors.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary malignancy of the liver and is currently the third leading cause of cancer deaths worldwide. The on-growing dimensions of the problem of liver cancer in combination with the inefficiency of conventional chemotherapeutic treatment methods highlight the need of new therapeutic approaches with one of the most promising being chemoprevention, that has recently been gaining ground.

A very important group of chemopreventive agents is the plant polyphenols. The present study examined the effect of 9 plant polyphenolic extracts of the genera *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* and *Sanguisorba* on the growth of liver cancer cell line HepG2. Their potency was assessed by the XTT cell proliferation assay.

The results of this study showed an inhibitory dose-dependent effect of all these extracts on the cell growth of HepG2 cell line with IC₅₀ values ranging from 42 (*Sanguisorba officinalis*) to 315 µg/mL (*Prunus prostrata*). Thus, these results suggested that the tested extracts exhibit some chemopreventive effect. The strongest effect was caused by *Sanguisorba officinalis* (IC₅₀ = 42 µg/mL). Consequently, it was also examined the ability of the most potent extract *Sanguisorba officinalis* to induce apoptosis in HepG2 cells after 0, 1, 4, 12 and 24 hours treatment using flow cytometry. The results revealed a reduction of the percentage of the liver cells from the initial 83,3% of the control cell population to 45,4%, 40,1%, 34,37%, 41,6% after 1, 4, 12 and 24 incubation hours respectively. Moreover, the percentage of apoptotic cells increased from 7,4% in control cells to 30,6%, 39,3%, 39% and 41,5% at 1, 4, 12 and 24 incubation hours respectively. Under the same conditions, the percentage of pro-apoptotic cells decreased from 9,02% in control cells to 3,43%, 6,45%, 7,13% and 7,13% respectively. In case of the necrotic cell population, the results showed an increase from 0,25% in control cells to 3,43%, 6,45%, 7,13% and 7,13% after 1, 4, 12 and 24 incubation hours.

The results of the present study showed, for the first time, a significant anticancer and anti-apoptotic activity of the tested plant polyphenolic extracts from *Rosaceae* family.

Περιεχόμενα

Περίληψη	06
Abstract	07
Περιεχόμενα	08
Περιεχόμενα Εικόνων	10
Περιεχόμενα Πινάκων	11
Περιεχόμενα Γραφημάτων	12

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1. Γενικά	13
1.1.2.Καρκινογένεση	14
1.1.3. Η θεωρία του πολυσταδιακού μοντέλου της καρκινογένεσης	16
1.1.4. Καρκίνος του ήπατος	18
1.1.4.1. Κυτταρική σειρά HepG2	22

1.2. ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

1.2.1. Γενικά	23
1.2.2. Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες	24
1.2.3. Απόπτωση	30

1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

1.3.1. Γενικά	31
1.3.2. Χημική δομή – Κατηγορίες πολυφαινολών	32
1.3.2.1. Φλαβονοειδή	34
1.3.2.2. Μη Φλαβονοειδή	37
1.3.3. Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών	38

1.4. ROSACEAE

1.4.1. Η οικογένεια των <i>Rosaceae</i>	43
---	----

1.4.1.1. Ταξινόμηση των <i>Rosaceae</i>	44
1.4.2. Φυτά της οικογένειας <i>Rosaceae</i> που εξετάζονται στην παρούσα εργασία	46
1.4.2.1. Εξετασθέντα φυτά του γένους <i>Prunus</i>	46
1.4.2.2. Εξετασθέντα φυτά του γένους <i>Pyacantha</i>	47
1.4.2.3. Εξετασθέντα φυτά του γένους <i>Pyrus</i>	48
1.4.2.4. Εξετασθέντα φυτά του γένους <i>Rosa</i>	48
1.4.2.5. Εξετασθέντα φυτά του γένους <i>Sanguisorba</i>	50
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	50
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
2.1. ΥΛΙΚΑ	
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	51
2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	51
2.1.3. Εκχυλίσματα	52
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2	52
2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο ΧΤΤ	53
2.2.2.1. Αρχή μεθόδου	53
2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία	54
2.2.3. Προσδιορισμός κυτταρικής απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής	55
2.2.3.1. Αρχή μεθόδου	57
2.2.3.2. Συσκευές κυτταρομετρίας ροής	53
2.2.3.3. Πειραματική διαδικασία	58
2.2.4. Στατιστική ανάλυση	60
<u>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	65
3.1. Προσδιορισμός της αντικαρκινικής ικανότητας των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων τη μέθοδο του ΧΤΤ	61
3.2. Προσδιορισμός πρόκλησης απόπτωσης από το ισχυρότερο εκχύλισμα σε καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2), σε συνάρτηση με το χρόνο με κυτταρομετρία ροής	68

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

72

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

77

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Απεικόνιση πολυσταδιακού μοντέλου καρκινογένεσης και δράσης χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Εικόνα 2: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στο ήπαρ 50χρονης γυναίκας που είχε διαγνωστεί θετική σε ηπατίτιδα C. Δείγμα αυτοψίας.

Εικόνα 3: Παγκόσμιως χάρτης τυποποιημένης ηλικίας θανάτου από HCC ανά 100.000 κατοίκους το 2004

Εικόνα 4: Μορφολογική σύγκριση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 (B)

Εικόνα 5: Οι δύο κυριότεροι τρόποι για την παραγωγή φαινολικών συστατικών στα φυτά (βιοσυνθετικοί οδοί σικιμικού και οξικού οξέος)

Εικόνα 6: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

Εικόνα 7: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των флаβονοειδών

Εικόνα 8: Χημικές δομές флаβονοειδών

Εικόνα 9: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών

Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις διαιτητικών πολυφαινολών

Εικόνα 11: Μηχανισμοί παρεμπόδισης καρκινογένεσης από διαιτητικές πολυφαινόλες

Εικόνα 52: Κλαδόγραμμα της οικογένειας Rosaceae σύμφωνα με την παραδοσιακή ταξινόμηση

Εικόνα 13: Φυλόγραμμα που παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτών της οικογένειας Rosaceae

Εικόνα 14: Φυτό του γένους *Prunus mahaleb*

Εικόνα 15: Φυτό του γένους *Prunus prostrata*

Εικόνα 16: Φυτό του γένους *Prunus webbii*

Εικόνα 17: Φυτό του γένους *Pyracantha coccinea*

Εικόνα 18: Φυτό του γένους *Pyrus spinosa*

Εικόνα 19: Φυτό του γένους *Rosa arvensis*

Εικόνα 20: Φυτό του γένους *Rosa canina*

Εικόνα 21: Φυτό του γένους *Rosa sempervirens*

Εικόνα 22: Φυτό του γένους *Sanguisorba officinalis*

Εικόνα 23: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

Εικόνα 24: α) αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer και καλυπτρίδες
β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του

Εικόνα 25: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της κυττρομετρίας

Εικόνα 26: Κυτταρόμετρο Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Εικόνα 27: Tube ανάλυσης δειγμάτων

Εικόνα 28: Χωστικές απόπτωσης Annexin V, 7-AAD και Binding Buffer

Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της κοκκίωσης (SSC) και του μέγεθος (FSC) των HepG2 κυττάρων που επώαστηκαν με το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis* σε συγκέντρωση 42μg/ml , κατά α)0, β)1, γ)4, δ)12 και ε)24 ώρες

Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μελέτης της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με Annexin V και 7AAD των HepG2 κυττάρων που επώαστηκαν με το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis* σε συγκέντρωση 42μg/ml , για α)0, β)1, γ)4, δ)12 και ε)24 ώρες.

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα από τα γένη *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*

Περιεχόμενα γραφημάτων

Γράφημα 1: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Prunus mahaleb*

Γράφημα 2: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Prunus prostrata*

Γράφημα 3: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Prunus webbii*

Γράφημα 4: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea*

Γράφημα 5: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Pyrus spinosa*

Γράφημα 6: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Rosa arvensis*

Γράφημα 7: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Rosa canina*

Γράφημα 8: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το υδατικό εκχύλισμα του *Rosa sempervirens*

Γράφημα 9: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*

Γράφημα 18: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC₅₀.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1.1 Γενικά

Ο καρκίνος είναι ένα από τα πιο συχνά και σοβαρότερα νοσήματα. Αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Από τις στατιστικές προκύπτει ότι ορισμένες μορφές καρκίνου προσβάλλουν περισσότερο από το 1/3 του πληθυσμού και ευθύνονται για περισσότερο από το 20% του συνολικού αριθμού των θανάτων, και στις αναπτυγμένες χώρες για περισσότερο από το 10% του συνολικού κόστους της ιατρικής περίθαλψης. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Εάν δεν αντιμετωπισθεί ο καρκίνος, χωρίς εξαιρέσεις, οδηγεί στο θάνατο. Η πρόωμη διάγνωση και η αντιμετώπιση σε πρώιμα στάδια είναι ζωτικής σημασίας. Επίσης, η ταυτοποίηση ατόμων που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να προσβληθούν από καρκίνο, πριν την εμφάνιση του νοσήματος, αποτελεί σημαντικό αντικείμενο της έρευνας για τον καρκίνο.

Οργανικά, ο καρκίνος είναι μία ασθένεια των κυττάρων, παρόλα αυτά δεν είναι ένα και μονό νόσημα. Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις πιο κακοήθεις μορφές νεοπλασίας, μιας παθολογικής διαδικασίας που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων (που ήταν φυσιολογικά μέχρι τη στιγμή της έναρξης της διαδικασίας καρκινογένεσης), ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυτταρικής μάζας ή όγκου (νεόπλασμα). Για το χαρακτηρισμό, όμως ενός νεοπλασματος ως καρκίνου, είναι απαραίτητο το νεόπλασμα να είναι κακοήθες, δηλαδή η αύξηση του να είναι ανεξέλεγκτη ή/και ο όγκος να μπορεί να εισβάλλει στους γειτονικούς ιστούς και να διασπείρεται σε πιο απομακρυσμένες θέσεις (μεταστατικός) (Thompson & Thompson, 2011).

Οι όγκοι που δεν είναι διηθητικοί ή μεταστατικοί δεν χαρακτηρίζονται ως καρκινικοί, αλλά ως καλοήθεις, παρόλο που το μέγεθος ή η θέση τους στο σώμα μπορεί να προκαλούν σημαντικά προβλήματα στον ασθενή. Υπάρχουν 3 κύριες μορφές καρκίνου:

1. Τα σαρκώματα, στα οποία ο όγκος προέρχεται από μεσεγχυματικό ιστό (όπως τα οστά και οι μύες), από συνδετικό ή από νευρικό ιστό.

2. Τα καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακό ιστό, όπως τα κύτταρα που επενδύουν το έντερο, τους βρόγχους και τους μαστικούς αγωγούς.
3. Οι αιμοποιητικές και λεμφοειδείς κακοήθεις νεοπλασίες όπως η λευχαιμία και το λέμφωμα, που διασπείρονται μέσω του μυελού των οστών, το λεμφικό σύστημα και το περιφερικό αίμα (Thompson & Thompson, 2011).

Σε κάθε μία από αυτές τις μορφές, οι όγκοι ταξινομούνται περαιτέρω βάσει της θέσης που εμφανίζονται, του τύπου του ιστού και του βαθμού της κακοήθειας. Ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησής τους από τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, διακρίνονται σε ανώτερης, μέσης, κατώτερης διαφοροποίησης και σε αναπλαστικούς όγκους, όταν η διαφοροποίηση έχει χαθεί και σημειώνεται ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και των πυρήνων τους. Όσο περισσότερο αδιαφοροποίητος είναι ένας όγκος, τόσο αυξάνεται η επιθετικότητά του.

Οι καλοήθεις όγκοι συνήθως, περιβάλλονται από κάψα, παραμένουν εντοπισμένοι και χαρακτηρίζονται ως ανώτερης διαφοροποίησης χωρίς να προκαλούν απειλητικά για τη ζωή προβλήματα. Οι καλοήθεις όγκοι του καλυπτήριου επιθηλίου ονομάζονται θηλώματα, του αδενικού επιθηλίου αδενώματα και οι κυστικοί όγκοι κυσταδενώματα. Ένας καλοήθης όγκος μπορεί να εξαλλαχθεί σε κακοήθη σε κάποιες περιπτώσεις. Οι κακοήθεις όγκοι έχουν ένα ταχύ δυναμικό ανάπτυξης, μπορούν να διηθούν τους γειτονικούς ιστούς και να δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις με αποτέλεσμα η μη έγκαιρη αντιμετώπιση τους να προκαλεί το θάνατο. Το μεγαλύτερο ποσοστό τους (80%) είναι επιθηλιακής προέλευσης, στερεοί όγκοι. Το 10% προέρχονται από λεμφικό ή αιμοποιητικό ιστό (λεμφώματα ή λευχαιμίες αντίστοιχα), ενώ υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό όγκων νευροενδοκρινούς προέλευσης.

1.1.2 Καρκινογένεση

Η νεοπλασία ή αλλιώς καρκινογένεση είναι μια ανώμαλη συσσώρευση κυττάρων που οφείλεται σε ανισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της φθοράς των κυττάρων. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται καθώς διανύουν τον κυτταρικό κύκλο και υπόκεινται σε μίτωση. Η φθορά, λόγω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου απομακρύνει κύτταρα από τους ιστούς.

Αναλυτικότερα, ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από κύτταρα, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Φυσιολογικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται, ώστε να προκύψουν θυγατρικά κύτταρα και να διατηρηθεί η υγεία του οργανισμού. Στα πρώτα χρόνια της ζωής, και μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου, ο ρυθμός διαίρεσης των κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού είναι έντονος. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαιρούνται μόνο για να αντικαταστήσουν άλλα που έχουν φθαρεί ή πεθάνει. Μερικές φορές, η διαδικασία αυτή εκτρέπεται από το φυσιολογικό, οπότε προκύπτουν νέα κύτταρα, που ο οργανισμός δεν χρειάζεται, ενώ παράλληλα τα παλιά κύτταρα δεν πεθαίνουν. Τα πλεονάζοντα κύτταρα σχηματίζουν μάζες, που καλούνται όγκοι. Σε μερικές περιπτώσεις τα παθολογικά αυτά κύτταρα κάνουν μετάσταση, δηλαδή εξαπλώνονται και σε άλλα μέρη του σώματος δημιουργώντας δευτερεύοντες όγκους (μεταστατικούς όγκους) παρόμοιους με αυτούς του αρχικού καρκίνου.

Η καρκινογενετική διαδικασία προϋποθέτει βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Τρεις βασικές κατηγορίες βλαπτικών παραγόντων ξεχωρίζουν: χημικές ουσίες, ακτινοβολία και ογκογόνοι ιοί (Ames B.N. et al, 1995). Κατά την πλειονότητά της (>70%) η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (καρκινογόνα μόρια στα τρόφιμα και την ατμόσφαιρα, δίαιτα, κάπνισμα κ.α.), σε ένα ποσοστό όμως, όπως προαναφέρθηκε, παραμένει γενετικό νόσημα, όχι με την αυστηρή έννοια του όρου αλλά ως μεγαλύτερη προδιάθεση ορισμένων ομάδων πληθυσμού για συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (Σκορίλας Α., 2008). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τη μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό, συνήθως επιδρούν περισσότεροι από έναν βλαπτικοί παράγοντες που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, σε συνδυασμό ή διαδοχικά (Κουρέτας Δ., 2003).

Αρκετές εναλλακτικές θεωρίες καρκινογένεσης, ωστόσο, βασίζονται σε επιστημονικές αποδείξεις και αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο. Έτσι μερικοί επιστήμονες πιστεύουν ότι ο καρκίνος μπορεί να προέρχεται από επιγενετικές αλλαγές (κληρονομικές και αντιστρεπτές αλλαγές εκτός της αλληλουχίας του DNA), (Jaffe LF, 2003) ή ανευπλοειδία (αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες σε χρωμοσώματα), (Rasnick D, Duesberg PH., 1999), περισσότερο από ότι από μεταλλάξεις. Ο καρκίνος έχει επιπλέον θεωρηθεί ως μεταβολική ασθένεια κατά την οποία επισυμβαίνει εκτροπή του μονοπατιού παραγωγής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στη γλυκόλυση και την παραγωγή ελευθέρων ριζών

1.Έναρξης (initiation) :

Το πρώτο αυτό στάδιο περιλαμβάνει την πρόκληση μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο προγεννήτορα (stem cell) (Potter VR.,1981), υπό την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Ο παράγοντας πιθανότατα στοχεύει σε γονίδια που σχετίζονται με την ικανότητα του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση. Συνέπεια της μετάλλαξης αυτής είναι η γέννηση ενός κυττάρου με ικανότητα συνεχούς αυτοανανέωσης (self renewal) ή αλλιώς ενός κυττάρου, που υπό τις κατάλληλες συνθήκες εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων (Trosko JE., Chang CC 1989), από ότι θα έκανε φυσιολογικά.

2.Φάση προαγωγής (promotion):

Το δεύτερο στάδιο διέπεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των αρχικά μεταλλαγμένων κυττάρων μέσω επίδρασης παραγόντων (promoters) που προάγουν τη μίτωση (Trosko JE. et al., 1989). Καθώς το μνημένο κύτταρο (initiated) συνεχίζει να διαιρείται υπερβαίνοντας τον φυσιολογικά προκαθορισμένο αριθμό διαιρέσεων του, στα κύτταρα απογόνους του προστίθενται ραγδαίες γενωμικές βλάβες που αυξάνουν δραματικά τη γενωμική αστάθεια. Από τα κύτταρα που προκύπτουν κάποιο και μόνο ένα αποκτά μια κρίσιμη μετάλλαξη η οποία και το μετατρέπει στο πρώτο προκαρκινικό κύτταρο. Πρέπει να σημειωθεί ότι το στάδιο αυτό είναι αντιστρεπτό με την απόσυρση του προαγωγέα (Κουρέτας Δ., 2003).

3.Φάση προόδου (Progression):

Στο στάδιο αυτό, γίνεται μετατροπή του μεταλλαγμένου και εξαρτώμενου από τον προαγωγέα κυττάρου, σε ένα καρκινικό, ανεξάρτητο από προαγωγέα κύτταρο. Φαίνεται ότι κάτω από τη συνεχή δράση του προαγωγέα, σε κάποιο κύτταρο, παρατηρείται η εμφάνιση γενετικών ανωμαλιών που αθροιστικά δίνουν τον καρκινικό φαινότυπο (Hennings H et al, 1983). Αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι για την καρκινική εξαλλαγή είναι απαραίτητες τουλάχιστον δύο γενετικές βλάβες, ενώ αρκετές ενδείξεις οδηγούν στο ότι η δεύτερη βλάβη σχετίζεται με απάλειψη αντιογκογονιδίων (Koufos A. et al,1985). Βέβαια, φαίνεται ότι στην ανάπτυξη των περισσότερων καρκίνων είναι απαραίτητες περισσότερες από δύο γενετικές βλάβες .

Συχνά, οι φάσεις της προαγωγής-προόδου περιγράφονται σαν μια κοινή φάση που ίσως τελικά να είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα (Marx J., 1989).

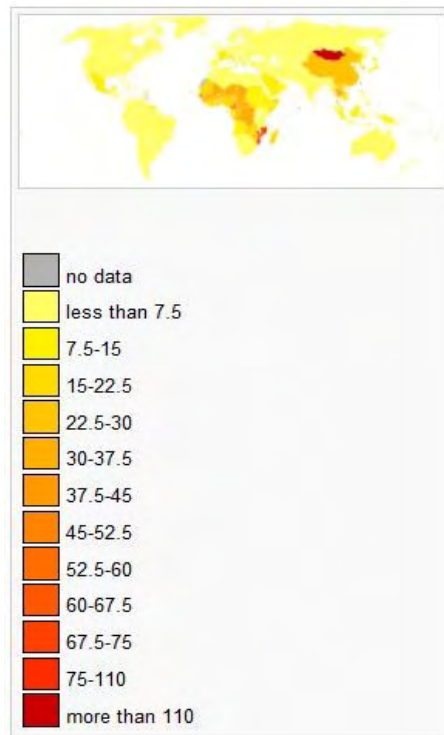
1.1.4 Καρκίνος του ήπατος



Εικόνα 7: Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στο ήπαρ 50χρονης γυναίκας που είχε διαγνωστεί θετική σε ηπατίτιδα C. Δείγμα αυτοψίας.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC, που ονομάζεται επίσης κακοήθες ηπάτωμα) ή αλλιώς πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος είναι ένας από τις πιο συχνούς όγκους, που αντιπροσωπεύει την πιο συχνή κακοήθεια σε όλο τον κόσμο και την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο (Parkin, 2001). Οι περισσότερες

περιπτώσεις HCC είναι δευτερεύουσες. Σημαντικότεροι παράγοντες που οδηγούν σε HCC είναι οι χρόνιες μολύνσεις από τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) ή της ηπατίτιδας C (HCV) (25% των αιτιών παγκοσμίως) (Alter MJ, 2007), η παρατεταμένη έκθεση σε μερικούς διατροφικούς καρκινογόνους παράγοντες, ιδίως σε αφλατοξίνη (Bosch, 1999, Pang, 2006), ο αλκοολισμός, και ενδεχομένως η παχυσαρκία (Neuschwander-Tetri, 2003) και ο διαβήτης (El-Serag, 2004). Οι χρόνιες μολύνσεις της ηπατίτιδας B και/ή C συμβάλλουν στην ανάπτυξη HCC προκαλώντας επανειλημμένα το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να επιτεθεί στα κύτταρα του ήπατος, μερικά από τα οποία μόνο έχουν μολυνθεί από τον ιό (Chien-Jen Chen, 2006). Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν κίρρωση διαφόρων αιτιολογιών όπως αλκοολική κίρρωση και κίρρωση που συνδέονται με γενετικές ασθένειες του ήπατος και πρωτογενή αιμοχρωμάτωση (Pang, 2006, El-Serag, 2001). Ακόμη, η νόσος του Wilson, σύμφωνα με την υπόθεση μερικών, αυξάνει τους κινδύνους εμφάνισης του HCC (Wang et al, 2002), αν και οι περιπτωσιολογικές μελέτες είναι σπάνιες (Cheng W. et al, 1992) και δείχνουν το αντίθετο, όπου η νόσος του Wilson στην πραγματικότητα μπορεί να παρέχει προστασία έναντι αυτού (Wilkinson et al, 1983). Έτσι, ο HCC εκδηλώνεται σε περιοχές με υψηλή συχνότητα εμφάνισης του HBV (π.χ. Νοτιοανατολική Ασία και την υπο-σαχάρια Αφρική) και HCV (π.χ. Νότια Ευρώπη) (Nordenstedt, 2010). Στη Βόρεια Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες πρωταρχική αιτία του HCC είναι η αλκοολική ηπατοπάθεια και ο HCV (El-Serag, 2001, Bosch, 2005, Mischiesen, 2005).



Εικόνα 8: Παγκόσμιος χάρτης τυποποιημένης ηλικίας θανάτου από HCC ανά 100.000 κατοίκους το 2004. (Vente MA., 2009)

Τα συμπτώματα του HCC περιλαμβάνουν την εμφάνιση ίκτερου, φουσκώματος από ασκίτιδα, εύκολων μελανιασμάτων, ανωμαλιών θρόμβωσης του αίματος ή ως απώλεια βάρους, κοιλιακούς πόνους ειδικά στο ανώτερο δεξί τεταρτημόριο, ναυτία, εμετό ή κόπωση.

Οι θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με HCC περιλαμβάνουν την χειρουργική εκτομή (Takayama, 1998) και τη μεταμόσχευση ήπατος, οι οποίες ισχύουν μόνο για ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με πρώιμους όγκους (Poon, 2004). Άλλες θεραπείες που χρησιμοποιούνται, κυρίως για την ανακούφιση των πασχόντων (Poon, 2002) από HCC, είναι η διαδερμική έγχυση αιθανόλης (Ebara 1990), η διαδερμική καυτηρίαση με ραδιοσυχνότητες (Curley, 2000) και με αρτηριακό εμβολισμό με καθετήρα (Ikeda, 1991). Όσον αφορά τη χημειοθεραπεία, μέχρι στιγμής, το μόνο φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του HCC είναι το sorafenib, αλλά με μέτρια ποσοστά επιβίωσης (Horgan, 2010).

Ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους οι ασθενείς με HCC έχουν κακή πρόγνωση είναι η πολυκεντρική εμφάνιση του HCC στο ήπαρ των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα ή η κίρρωση που προκαλείται κυρίως από λοίμωξη HBV ή HCV (Yamamoto, 1999). Έτσι, ακόμη και αν ο πρώτος καρκίνος διαγνωστεί και

απομακρυνθεί, ένας άλλος παθολογικός κυτταρικός κλώνος μπορεί να προκύψει για να σχηματιστεί ένας δεύτερος πρωτοπαθής καρκίνος (Moriwaki, 2002). Επιπλέον, μπορεί να υπάρξει υποτροπιασμός σε ασθενείς με HCC που οφείλεται σε ενδοηπατική μετάσταση, δηλαδή την εμφάνιση ενός κυτταρικού κλώνου που προέρχεται από τη μετατροπή αρχικού κλώνου κυττάρων (Chen, 2000). Η συχνότητα του περιοδικού αυτού καρκίνου του ήπατος εκτιμάται ότι είναι κατά 20-25% ετησίως. Επιπλέον, ένας άλλος λόγος για την κακή πρόγνωση του HCC είναι η επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της θεραπείας του HCC (Nagasue, 1999, Eguchi 2000). Ως εκ τούτου, λόγω του γεγονότος ότι οι τρέχουσες θεραπείες για HCC δεν είναι τόσο αποτελεσματικές, χρειάζονται νέες στρατηγικές για να εμποδίζουν την ανάπτυξη ή την μετά-θεραπευτική επανάληψη του HCC, αλλά και να μην συνεισφέρουν σε τυχόν επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας.

Η θεραπευτική τακτική εξαρτάται από:

- το μέγεθος του όγκου
- το στάδιο της νόσου (δηλαδή την έκταση της εξάπλωσης της)
- τη βιολογική ηλικία (όχι την πραγματική αλλά την ποιότητα της υγείας για τη δεδομένη ηλικία)
- την κατάσταση του ήπατος (πόσο καλά λειτουργεί)
- τη γενική κατάσταση του ασθενούς
- την παρουσία καψιδίου του όγκου
- την παρουσία εξωηπατικών μεταστάσεων
- την παρουσία θυγατρικών οξιδίων
- την αγγείωση του όγκου

Ο γιατρός, ο οποίος πρέπει να είναι εξειδικευμένος στο συγκεκριμένο αντικείμενο, μπορεί να συστήσει χειρουργική θεραπεία, χημειοθεραπεία (συστηματική, δηλαδή με ενδοφλέβια χρήση φαρμάκων που διαχέονται σε όλο το σώμα ή περιοχική, δηλαδή με χορήγηση φαρμάκων με ειδικό σύστημα από την ηπατική αρτηρία που εγχέονται απευθείας μόνο στο ήπαρ σε συνδυασμό ή όχι με εμβολισμό) ή ακτινοβολία και βιολογική θεραπεία (που ενισχύει τον οργανισμό στην καταπολέμηση της νόσου με τις ίδιες τις δυνάμεις του - αυτή λέγεται και ανοσοθεραπεία). Μπορεί να συστηθεί επίσης συνδυασμός δύο ή περισσότερων από τις παραπάνω θεραπευτικές δυνατότητες. Γενικώς, ο καρκίνος του ήπατος αντιμετωπίζεται δύσκολα εκτός και εάν ο όγκος είναι σχετικά μικρός και εντοπίζεται στον ένα λοβό του ήπατος αλλά, στις περισσότερες περιπτώσεις, η διάγνωση της

νόσου γίνεται σε προχωρημένο στάδιο, όπου ο καρκίνος είναι ανεγγείρητος. Η χειρουργική θεραπεία, όταν ενδείκνυται, αποτελεί τη μόνη και πιο αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή που μπορεί να προσφέρει και μόνιμη θεραπεία. Η μεταμόσχευση του ήπατος εφαρμόστηκε κατά το παρελθόν αλλά αποδείχθηκε ότι συνήθως ο καρκίνος εμφανίζεται πάλι (υποτροπή) και σήμερα δεν συνιστάται. Όταν, η χειρουργική θεραπεία, όπως συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν έχει θέση στην αντιμετώπιση της νόσου, εφαρμόζοντας τις άλλες μορφές θεραπείας που είναι παρηγορικού τύπου (όχι θεραπευτικές), ο ασθενής μπορεί να ανακουφιστεί από τα συμπτώματά του και να του προσφερθεί καλύτερη ποιότητα ζωής ή και ακόμη να επιμηκυνθεί ο χρόνος επιβίωσής του.

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

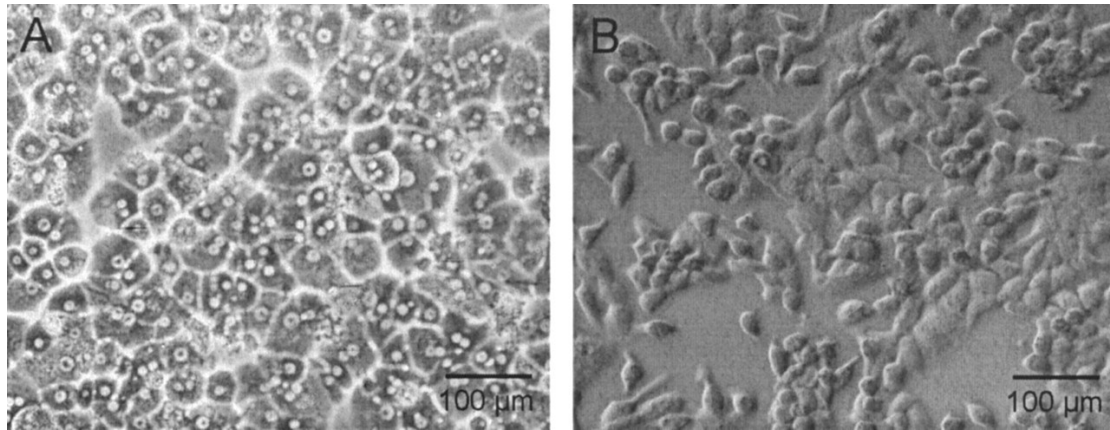
παραγόντων για την αναστροφή, καταστολή ή την πρόληψη καρκινικής ανάπτυξης σε καρκίνο (Sporn & Liby 2005). Πολλοί χημειοπροστατευτικοί παράγοντες είναι φυτοχημικές ουσίες, δηλαδή μη θρεπτικές χημικές ουσίες των φυτών που έχουν προστατευτικές ή ιδιότητες πρόληψης ασθενειών.

1.1.4.1 Κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2

Τα HepG2 είναι προσκολλητικά κύτταρα, με μορφή που θυμίζει κύτταρα επιθηλιακά. Αναπτύσσονται ως μονοστιβάδες και σχηματίζουν μικρά συσσωματώματα. Η HepG2 κυτταρική σειρά είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά, που προέρχεται από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού αγοριού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα HepG2 εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, α-2-μακροσφαιρίνη, πλασμινογόνο. Τα HepG2 αποκρίνονται σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (HGH).

Με τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα HepG2 εμφανίζουν ισχυρή μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση με ένα ελεγχόμενο σχηματισμό των κορυφαίων και βασεοπλευρικών τομέων κυτταρικής επιφάνειας (van IJzendoorn et al, 1997, 2000), που μοιάζουν με τους καναλιοειδείς (BC) και τους ημιτονοειδείς τομείς της χολής, αντίστοιχα, σε βιολογικό περιβάλλον.

Λόγω του υψηλού βαθμού μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης *in vitro*, τα κύτταρα HepG2 είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης και τη δυναμική των καναλιών του χοληδόχου πόρου και των μεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Αυτό μπορεί να είναι σημαντικό για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών του ήπατος που προκαλούνται από μία εσφαλμένη υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών επιφανείας κυττάρου, π.χ. ελαττώματα στη λειτουργία των ηπατικών καναλιών-μεταφορών, όπως στη νόσο Dubin-Johnson, (PFIC), και οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τα κύτταρα HepG2 και τα παράγωγά τους χρησιμοποιούνται επίσης ως ένα σύστημα μοντέλου στη μελέτη του μεταβολισμού του ήπατος και στην τοξικότητα ξενοβιοτικών, την ανίχνευση κυτταροπροστατευτικών και αντι-γενοτοξικών παραγόντων, την κατανόηση της ηπατοκαρκινογένεσης, και για μελέτες στοχοθέτησης φαρμάκων. Τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται επίσης σε δοκιμές με βιο-τεχνητές συσκευές ήπατος.



Εικόνα 9: *Μορφολογική σύγκριση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (A) και ηπατοκυττάρων της κυτταρικής σειράς HepG2 (B). Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα εμφανίζουν το τυπικό κυβικό σχήμα, και τα HepG2 κύτταρα δείχνου μορφολογία παρόμοια με επιθηλιακά κύτταρα*

1.2 ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

1.2.1 Γενικά

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι το 80% περίπου των καρκίνων στον άνθρωπο οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η έκθεση σε χημικά καρκινογόνα, το κάπνισμα, η διατροφή και το εργασιακό περιβάλλον (ACS, 1995, De Flora & Ferguson, 2005). Η καλύτερη κατανόηση των επιμέρους σταδίων της καρκινογενετικής διαδικασίας και των μηχανισμών που την διέπουν, έδειξαν πως υπάρχουν στάδια, τα οποία μπορούν να προληφθούν. Γνωρίζοντας λοιπόν τους μοριακούς μηχανισμούς δημιουργίας του καρκίνου, προσπαθούμε να αναστείλουμε ή να εμποδίσουμε τα αρχικά στάδια (όπως την εισδοχή των καρκινογόνων ουσιών στα κύτταρα, την ενεργοποίηση των προκαρκινικών ουσιών σε καρκινικές, τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων κλπ.), (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Σήμερα, μια πολύ σημαντική προσέγγιση για την πρόληψη του καρκίνου θεωρείται η χημειοπροστασία, ιδιαίτερα μέσω των φυσικών συστατικών της διατροφής (Shukla et al., 2004, Surch, 2003). Ως χημειοπροφύλαξη ή χημειοπροστασία ορίζεται η πρόληψη, η αναστολή ή η αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσότερων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφίμων (Sporn M.B et al, 1976, Hong & Sporn, 1997; Kelloff et al., 2004). Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί ότι χημειοπροφύλαξη και πρόληψη διαφέρουν. Η πρόληψη αναφέρεται στην αλλαγή συνηθειών (καλύτερη διατροφή,

άσκηση, αποφυγή καπνίσματος). Αντίθετα, η χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση συμπληρωμάτων διατροφής τα οποία περιέχουν τα υποτιθέμενα ενεργά συστατικά διατροφικών πηγών, όπως φρούτα και λαχανικά (Κωνσταντίνου Α., 2008).

Η στρατηγική της χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο, την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001, Smith et al., 2005). Η παρεμπόδιση της καρκινογένεσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών προσεγγίσεων: α) μείωση της έκθεσης σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα μέσω ελέγχου του εργασιακού περιβάλλοντος και ενθάρρυνσης της αλλαγής του τρόπου ζωής, β) εντοπισμός των πληθυσμιακών ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου εξαιτίας γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, έτσι ώστε να γίνονται σε αυτούς συχνές κλινικές εξετάσεις και γ) εξασφάλιση της χημειοπροστασίας με διαιτητικά ή συνθετικά μέσα. Ανάμεσα στις τρεις άνωθεν προσεγγίσεις πολύ σημαντική θεωρείται η τελευταία, διότι οι δύο προηγούμενες απαιτούν ακριβή γνώση των αιτιολογικών παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση (Shureiqi et al, 2000, Stoner et al., 1997).

1.2.2 Χημειοπροστατευτικοί παράγοντες

Απόλυτη ταξινόμηση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων δεν είναι εφικτή. Κύρια αιτία αποτελεί το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης αρκετών ενώσεων παραμένει ακόμη άγνωστος. Επιπλέον, σύμφωνα με τον περισσότερο δραστικό μηχανισμό, η αυτή κατάταξη δυσχεραίνεται από το ότι πολλοί από τους παράγοντες φαίνεται να δρουν μέσω περισσότερων του ενός μηχανισμών (πλειοτροπική δράση) καθώς και να αλληλεπιδρούν ποικιλοτρόπως, είτε μεταξύ τους είτε με τους καρκινογόνους παράγοντες. Ακόμη, διάφοροι παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η βιοδιαθεσιμότητα, ο τρόπος εισαγωγής των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων στον οργανισμό επηρεάζουν έντονα αυτούς τους μηχανισμούς δράσης (De Flora & Ferguson, 2005, Kelloff et al., 2005).

Το 1985, ο Wattenberg επιχείρησε την πρώτη ταξινόμηση των χημειοπροστατευτικών παραγόντων στηριζόμενος στα αποτελέσματα *in vivo* δοκιμών σε πειραματόζωα (Wattenberg, 1985). Στην πορεία των χρόνων, βέβαια,

πολλές μελέτες έχουν εμπλουτίσει την αρχική τους ταξινόμηση (Kelloff et al., 2004, 2000, Shukla et al., 2004, De Flora et al., 2001). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τον Wattenberg, οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το στάδιο της καρκινογένεσης στο οποίο επιδρούν. Η κατάταξη έχει ως εξής:

- i. Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου.
- ii. Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.
- iii. Παράγοντες παρεμπόδισης ή καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης. Αναστέλλουν την προαγωγή και την πρόοδο της καρκινογένεσης.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, είναι πολλοί και κατατάσσονται τόσο στην πρόληψη όσο και στη μετέπειτα προστασία.

i.Αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου

Οι αναστολείς σχηματισμού του καρκινογόνου έχουν προστατευτική δράση πριν την έναρξη της διαδικασίας της καρκινογένεσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι παρεμποδιστές σχηματισμού των νιτροζαμίνων από δευτερογενείς αμίνες και νιτρώδη σε όξινο περιβάλλον (Stoner et al., 1997). Ειδικότερα, συναντούμε αναγωγικά οξέα (π.χ. ασκορβικό οξύ), φυτικές πολυφαινόλες (π.χ. καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ), σουλφυδρυλικές ενώσεις (π.χ. Ν-ακετυλοκυστεΐνη) και διάφορα αμινοξέα (π.χ. προλίνη, θειοπρολίνη). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα στη συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς η βιταμίνη C, όπως είναι ευρύτερα γνωστή. Δρα ελαττώνοντας το σχηματισμό νιτροζαμίνης από δευτερογενείς αμίνες ή νιτρώδη στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και οδηγεί σε ελάττωση όγκων του πνεύμονα σε ποντικούς (Mirvish 1981, Hartman και Shankel 1990, Κουρέτας 2003).

ii.Παράγοντες παρεμπόδισης του καρκινογόνου. Αναστέλλουν την πρώτη φάση της καρκινογένεσης.

Οι παράγοντες παρεμπόδισης της δράσης του καρκινογόνου (blocking agents) δρουν κυρίως στο στάδιο της έναρξης (Κουρέτας Δ., 2003), αλλά και στο στάδιο της προόδου της καρκινογενετικής διαδικασίας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, αναστέλλουν τη δράση γενοτοξικών παραγόντων, εξουδετερώνουν ηλεκτρονιόφιλους παράγοντες και ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διατηρούν τη γενωμική σταθερότητα και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (Stoner et al., 1997; De Flora & Ferguson, 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω, στη συγκεκριμένη κατάταξη προκύπτουν οι παρακάτω κατηγορίες παραγόντων παρεμπόδισης της δράσης των καρκινογόνων:

1. Αναστολείς του κυτοχρώματος P450. Τα ένζυμα της φάσης I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών, όπου κυρίαρχο ρόλο έχουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μπορεί να μετατρέπουν προ-καρκινογόνα σε καρκινογόνα. Ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του P450 θεωρούνται ότι μπορεί να παρεμποδίζουν την καρκινογένεση.

2. Επαγωγείς των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Οι ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II θεωρούνται αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας και της απέκκρισης των ξενοβιοτικών ουσιών. Συνεπώς, ουσίες που επάγουν τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. την τρανσφεράση της γλουταθειόνης-GST) πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην απομάκρυνση καρκινογόνων ουσιών (Κουρέτας Δ., 2003).

3. Εξουδετερωτές των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών και των ελευθέρων ριζών. Βλάβες στο DNA των κυττάρων προκαλούνται από την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονιοφιλικών «τελικών» καρκινογόνων (μεταβολικά ενεργά καρκινογόνα) ή των διαφόρων ελευθέρων ριζών με το DNA. Συνεπώς η εξουδετέρωσή τους αποτελεί βασικό μηχανισμό χημειοπροφυλακτικής δράσης.

4. Επαγωγείς των ενζύμων αποκατάστασης βλαβών του DNA. Πρόκειται για ένζυμα ή φυσικές ουσίες που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στους μηχανισμούς αποκατάστασης βλαβών του DNA.

iii. Παράγοντες καταστολής της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Η ταξινόμηση των παραγόντων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι πιο δύσκολη, γιατί τα κρίσιμα γεγονότα και η ακριβής αλληλουχία τους κατά την προαγωγική φάση και τη φάση της προόδου της καρκινογένεσης, δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Ωστόσο, όπως προτάθηκε από τους Morse και Stoner (Morse MA et al, 1993), τους DeFlora και Ramel (De Flora S. et al, 1990) και τους Kelloff και συνεργάτες (Kelloff GJ et al, 1994), οι περισσότερες από τις χημειοπροφυλακτικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας μπορεί να ταξινομηθούν σαν:

1. Αναστολείς του μεταβολισμού των πολυαμινών. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η νεοπλασματική εξαλλαγή σχετίζεται με τη συγκέντρωση των πολυαμινών που συχνά είναι αυξημένη στους καρκινικούς ιστούς. Υπάρχουν παράγοντες που εμφανίζουν ανασταλτική δράση ως προς το μεταβολισμό των πολυαμινών.

2. Επαγωγείς της τελικής διαφοροποίησης. Η έλλειψη της κυτταρικής διαφοροποίησης αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων. Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι η αποκατάσταση της ικανότητας των κυττάρων προς διαφοροποίηση έχει τη δυνατότητα να καταστείλει την καρκινογένεση. Ορισμένοι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Α και το ρετινοϊκό οξύ, προκαλούν διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή της καρκινογένεσης (Huang et al, 1986, Sani et al, 1990).

3. Ρυθμιστές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα ενδιάμεσα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος μπορεί να αποτελέσουν στόχους χημειοπροφύλαξης με σκοπό τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα φλαβονοειδή που αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης C, συμβάλλοντας έτσι σε καταστολή της καρκινογένεσης. (Kelloff GJ, et al, 1997).

4. Ρυθμιστές της δράσης των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων.

Εδώ μπορεί να έχουμε μια πιο άμεση αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας ορμονών και αυξητικών παραγόντων που γίνεται επεμβαίνοντας στους υποδοχείς τους στην κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη. Σχετικό παράδειγμα είναι τα αντι-οιστρογόνα (π.χ. ταμοξιφαίνη) που συνδέονται με τους πυρηνικούς υποδοχείς των οιστρογόνων αναστέλλοντας έτσι τη σύνδεση και προαγωγική δράση των οιστρογόνων σε πολλούς ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους (Jordan VC, 1992). Οι χημειοπροφυλακτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν άμεσα, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω ρύθμισης της επαγωγής ή της δραστηριότητας ειδικών ορμονών ή αυξητικών παραγόντων.

5. Αναστολείς της δράσης των ογκογονιδίων. Μεγάλο κομμάτι της έρευνας σχετικά με την ανασταλτική δράση των χημειοπροφυλακτικών παραγόντων έναντι των ογκογονιδίων έχει εστιαστεί στο ογκογονίδιο ras, η ενεργοποίηση του οποίου προϋποθέτει τη φαρνεσυλίωσή του. Η ουσία D-λιμονίνη που υπάρχει στα κίτρα, αναστέλλει την πρόοδο των όγκων του μαστού αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν χημικά καρκινογόνα (Elson et al, 1998).

6. Επαγωγείς της διακυτταρικής επικοινωνίας. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι πόροι ή κανάλια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων που συμβάλλουν στην επικοινωνία μεταξύ τους. Αυτή η επικοινωνία αναστέλλεται στους όγκους. Ουσίες όπως το ρετινοϊκό οξύ, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο που προάγουν τη διακυτταρική επικοινωνία μέσω των χασμοσυνδέσμων δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Zhang et al, 1991, Κουρέτας Δ, 2003).

7. Επαγωγείς της ανοσολογικής απόκρισης. Υπάρχουν χημειοπροστατευτικοί παράγοντες που έχουν επαγωγικές δράσεις της ανοσολογικής απόκρισης. Σχετικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη Ε που σε

κάποιες δόσεις αυξάνει την παραγωγή αντισωμάτων και το ρετινοϊκό οξύ που συμβάλλει στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killers-NK).(Hill DL, Grubbs CJ. 1992).

8. Επαγωγείς της απόπτωσης Η απόπτωση (ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α., 1997). Διαταραχή αυτής της ομοιόστασης μπορεί να έχει σοβαρές παρενέργειες, όπως η καρκινογένεση. Παράδειγμα επαγωγέα της απόπτωσης είναι το τριοξειδίο του αρσενικού που επάγει την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα. Αυτό ενεργεί άμεσα επί της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου εξαλείφοντας το δυναμικό αυτής και οδηγώντας στην αναστολή της έκφρασης του Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3. Χορηγείται για την αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (Zhu J et al., 2002).

9. Ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA. Η υπομεθυλίωση του DNA προκαλεί αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αρκετές ουσίες που αναστέλλουν την καρκινογένεση λειτουργούν ως δότες μεθυλομάδων.

10. Αναστολείς της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν και ένζυμα που συντελούν στη λύση της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεάσες (ελαστάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση) και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου. Η χημειοπροστατευτική δράση των αναστολέων των πρωτεασών σε κάποιο ποσοστό οφείλεται στην αναστολή λύσης της βασικής μεμβράνης.(Kennedy AR., 1998).

11. Αναστολείς του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ανάμεσα στα άλλα που λαμβάνουν χώρα κατά τη φάση προαγωγής της καρκινογένεσης συμβαίνει και αύξηση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος που

συμμετέχει στην φλεγμονώδη αντίδραση. Οι κυκλοοξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνια, ενώ οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια και υδροξυεικοσιτετρανοϊκά οξέα (Κουρέτας Δ, 2003). Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών παράγονται αρκετά είδη ελευθέρων ριζών. Σύμφωνα με μελέτες, αναστολείς των κυκλοοξυγενασών (αντιφλεγμονώδη φάρμακα και φυτικές πολυφαινόλες) δρουν ανασταλτικά στην καρκινογένεση (Reddy BS et al, 1987). Επιπροσθέτως αναστολείς της λιποξυγενάσης (π.χ. βιταμίνη E) αναστέλλουν την φάση προαγωγής της καρκινογένεσης στην επιδερμίδα ποντικών (Huang MT et al, 1991).

1.2.3 Απόπτωση

Όπως αναφέρθηκε ένας βασικός χημειοπροφυλακτικός μηχανισμός είναι η επαγωγή απόπτωσης. Η ακριβής ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι βασική προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία ενός ιστού και την αποφυγή της υπερπλασίας ή της εκφύλισης του, ως επακόλουθο υπέρμετρης ή ελλειμματικής κυτταρικής αύξησης, αντίστοιχα. Εξίσου μεγάλης σημασίας είναι και η διεργασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης, με την οποία στους φυσιολογικούς ιστούς, απομακρύνονται περιττά ή ελαττωματικά κύτταρα, προς όφελος των υπολοίπων (Κιτράκη και Τρούγκος, 2006).

Όταν τα κύτταρα δεν είναι πλέον απαραίτητα ή δεν μπορούν να προχωρήσουν σε αντιγραφή εξαιτίας μόλυνσης από ιό, αυτοκτονούν με μια διαδικασία γνωστή ως απόπτωση. Απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καλείται η διαδικασία κυτταρικού θανάτου με βάση συγκεκριμένες γονιδιακές εντολές που εκτελούνται σε ένα κύτταρο. Οι εντολές για το 'πρόγραμμα απόπτωσης' που εκτελείται, βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα, αλλά ενεργοποιούνται σε ορισμένα μόνο κύτταρα από συγκεκριμένα σήματα, ενδοκυτταρικής ή εξωκυτταρικής προέλευσης, που η φύση τους ποικίλλει. Αυτά τα σήματα ακολουθούν διαφορετικές πορείες στα αρχικά τουλάχιστον στάδια, αλλά σε μεταγενέστερα στάδια συγκλίνουν (Κιτράκη και Τρούγκος, 2006). Ο κυτταρικός θάνατος γενικά κατηγοριοποιείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την απόπτωση που αντιπροσωπεύει τον ενεργό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και τη νέκρωση που αντιπροσωπεύει το παθητικό κυτταρικό θάνατο χωρίς να είναι γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί που τη διέπουν (Gammal-Eldeen and Hegazy, 2010, Kong, 2009). Είναι δύο διακριτές

λειτουργίες του κυτταρικού θανάτου που διαφέρουν στη μορφολογία, στο μηχανισμό και στη συχνότητα (Dive et al, 1992).

Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης έχουμε κυτταρική διόγκωση, διάρρηξη, ταχεία αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης (Kalka et al, 2000), μεταβολική κατάρρευση και εξάντληση του ATP (Dive et al, 1992). Ενώ κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή (Kalka et al, 2000, Kim et al, 2012). Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική και αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή. Η απόπτωση χωρίζεται σε τέσσερα στάδια, το στάδιο της απόφασης, που είναι αντιστρεπτό, την εκτέλεση, την αποδόμηση και τη φαγοκυττάρωση.

Πριν η πραγματική διαδικασία απόπτωσης λάβει χώρα, αποπτωτικά σήματα πρέπει να ωθήσουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες να αρχίσουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτό το στάδιο επιτρέπει τα αποπτωτικά σήματα να προκαλέσουν το κυτταρικό θάνατο ή η διαδικασία να σταματήσει αν το κύτταρο δε χρειάζεται να πεθάνει (Khan, 2010). Πολλές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην απόπτωση, αλλά έχουν αναγνωριστεί δύο κύριες μέθοδοι ρύθμισης, η στόχευση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων (μονοπάτι εκ των έσω) και η άμεση με τη μεταβίβαση του σήματος μέσω πρωτεϊνών προσαρμογέων (Mehta et al, 2010).

1.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

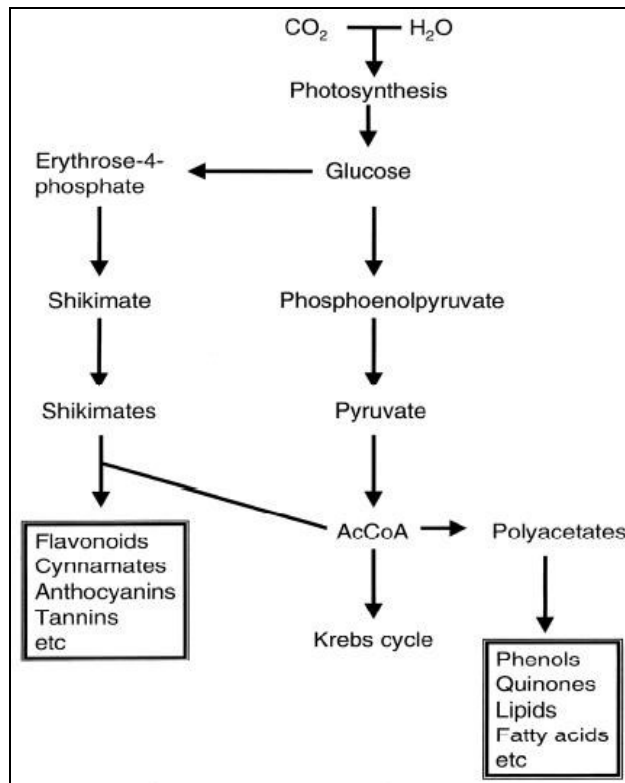
1.3.1 Γενικά

Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι ουσίες φυτικής προέλευσης που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι πολυφαινόλες είναι οι κυριότερες βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις των τροφίμων, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο για τις βιολογικές τους ιδιότητες (Σπανού Χ, 2010). Είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harborne, 1993, Bravo, 1998). Αποτελούν τα κυριότερα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Έτσι, συνιστούν μία από τις πολυπληθέστερες και περισσότερο διαδεδομένες ομάδες φυτικών μεταβολιτών και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου, καθώς είναι πλούσιες στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή,

τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις οι οποίες αποδόθηκαν στις φυτοχημικές ενώσεις που περιέχουν (Kris- Etherton PM et al, 2002). Γενικά στις πολυφαινόλες οφείλεται το χρώμα και γευστικά χαρακτηριστικά των οίνων (στυφάδα, τραχύτητα) και το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών, καθώς σχετίζονται με τους μηχανισμούς αντίστασής τους απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα (Manach et al, 2004, Vermeris & Nicholson, 2006, Crozier et al, 2006). Τα τελευταία 50 χρόνια υπάρχει ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες εξαιτίας κυρίως των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και των πιθανών χημειοπροστατευτικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία (Dew T.P, et al, 2005).

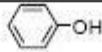

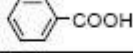
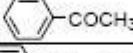
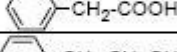
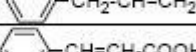
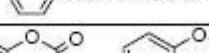
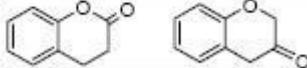
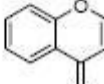
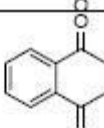
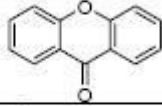
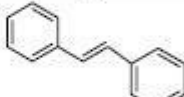
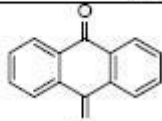
1.3.2 Χημική δομή-κατηγορίες πολυφαινολών

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Πρόκειται, είτε για απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις, όπως οι ταννίνες. Προκύπτουν από δύο κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert et al, 2005)



Εικόνα 5: Οι δύο κυριότεροι τρόποι για την παραγωγή φαινολικών συστατικών στα φυτά (βιοσυνθετικοί οδοί σικιμικού και οξικού οξέος)

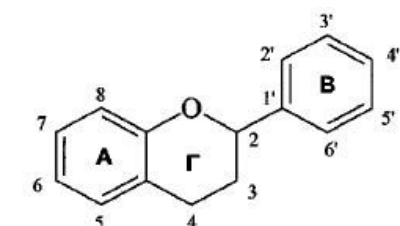
Στη φύση ανευρίσκονται κυρίως στη συζευγμένη τους μορφή, είτε μεθυλιωμένες, είτε ως γλυκοζίτες. Το υδατανθρακικό τμήμα τους μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη και ολιγοσακχαρίτης. Η γλυκόζη είναι ο πιο κοινός εκπρόσωπος των σακχάρων τους, αν και απαντώνται επίσης γαλακτόζη, παμνόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι επίσης ενωμένες με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες και λιπίδια. Όσον αφορά τη διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια, αφού άλλες ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές, άλλες διαλύονται μόνο σε οργανικούς διαλύτες και άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή. Διακρίνονται τουλάχιστον σε 10 κατηγορίες (Harborne, 1989) ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους, δηλαδή ανάλογα του αριθμού των αρωματικών δακτυλίων που φέρουν και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους.

Απλές φαινόλες		Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, σιριγγικό, βανιλικό (αλδεΐδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνά στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοειδή		
(Υόροξυ)κινναμωμικά οξέα		Φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στίβενια		
Ανθρακινόνες		Εμοδίνη κλπ
Φλαβονοειδή		
Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες		

Εικόνα 6: Οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων

Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι τα φλαβονοειδή, και τα μη-φλαβονοειδή.

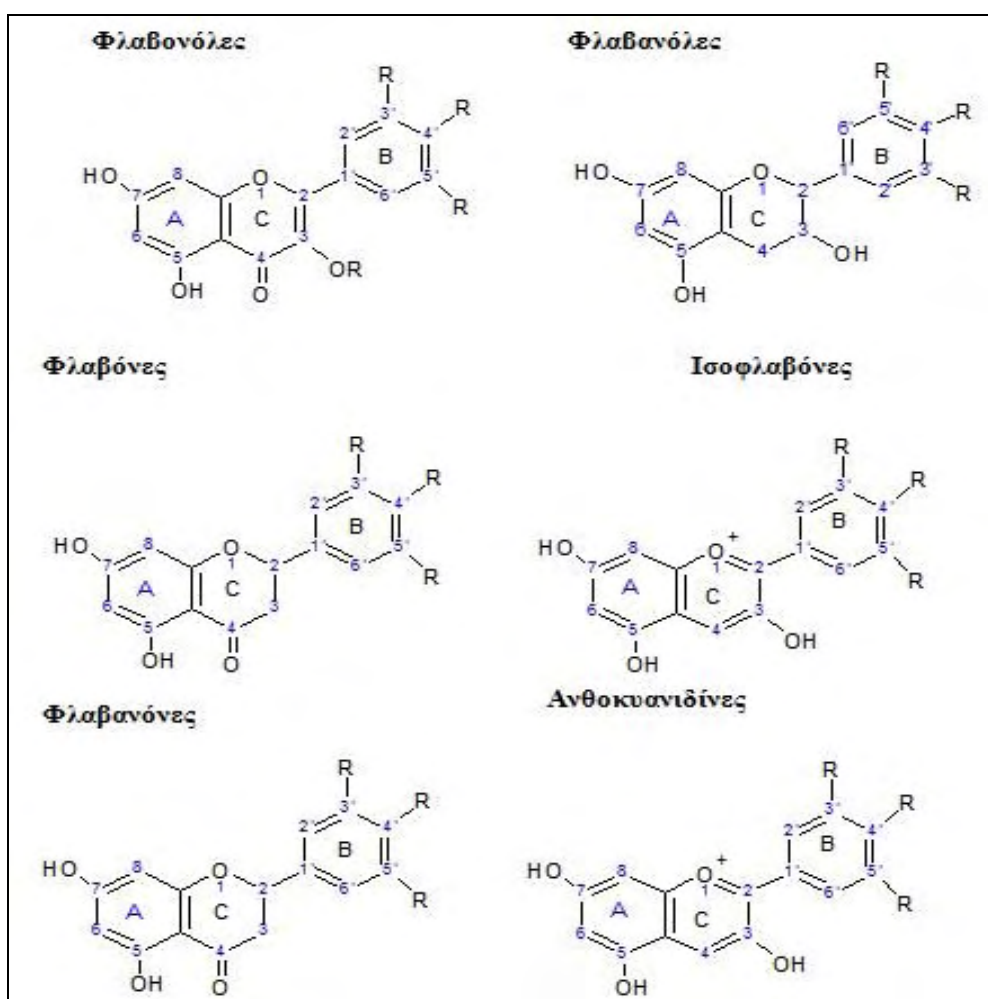
1.3.2.1 Φλαβονοειδή



Εικόνα 7: Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα, αφού περιλαμβάνουν πάνω από 4000 αναγνωρισμένα στελέχη (Cheynier, 2005). Στις ενώσεις αυτές αποδίδεται το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Έχουν κοινή δομή, η οποία χαρακτηρίζεται από 2 βενζολικούς (αρωματικούς) δακτυλίους (A και B) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου, τριών

ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (Γ). Παρουσιάζουν δηλαδή τη δομή (C6 – C3 – C6). Ο βασικός ανθρακικός σκελετός των φλαβονοειδών λοιπόν περιέχει 15 άτομα άνθρακα. Έχουν σχετικά μικρά μοριακά βάρη και είναι γενικά ευδιάλυτα, ανάλογα με την πολικότητα και τη χημική τους δομή (αριθμός υδροξυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, ακυλίωσης, κλπ). Οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεων συνίστανται στο δακτύλιο πυρόνης (παρουσία ή απουσία διπλού δεσμού ή 3-υδροξύ ή 2-οξο ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτυλίους A και B (Vinson, 1998). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες: τις φλαβονόλες (κερκετίνη, καμπεφρόλη, μυρικετίνη), τις φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, προανθοκυανιδες), τις φλαβόνες (γλυκοσίδια της λουτεολίνης και της απιγενίνης), τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες (βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή) και τις ανθοκυανιδίνες (Manach C. et al, 2004).



Εικόνα 8: Χημικές δομές φλαβονοειδών. R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006)

Αναλυτικότερα:

Φλαβονόλες: αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά και άφθονα φλαβονοειδή των τροφίμων. Βρίσκονται στις περισσότερες τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο με σημαντικότερες πηγές τους να είναι τα κρεμμύδια, τα πράσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach C, et al, 2004). Οι φλαβονόλες συνήθως βρίσκονται με τη γλυκοσυλιωμένη τους μορφή με τα συζευγμένα σάκχαρα να είναι κυρίως η γλυκόζη και η ραμνόζη. Κυριότερες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη και η καμπερόλη.

Φλαβόνες: βρίσκονται κυρίως στο σέλινο, το μαϊντανό, στα δημητριακά (σε γλυκοσυλιωμένη μορφή κυρίως) και στα εσπεριδοειδή (σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Shahidi F, Naczki M. 1995). Υπάρχουν κυρίως ως 7-O-γλυκοσίδια με κυριότερους εκπροσώπους τη λουτεολίνη και την απιγενίνη.

Ισοφλαβόνες: χαρακτηριστικό των ισοφλαβονών είναι οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 7' και 4', μια δομή που προσδίδει στις ισοφλαβόνες ιδιότητα φυτοοιστρογόνου και την ικανότητα να δεσμεύονται σε υποδοχείς οιστρογόνων. Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα ψυχανθή και ιδιαίτερα τη σόγια, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ντανζεΐνης και γενιστεΐνης. (Manach C. et al, 2004).

Φλαβανόνες: βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά (μέντα) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή. (Tomas-Barberan FA, Clifford MN., 2000). Κυριότερες φλαβανόνες αποτελούν η ναριγενίνη, η εσπερετίνη και η εριονκτιόλη. Η χημική τους δομή επιτρέπει τη σύνδεση των υδροξυλομάδων με σάκχαρα και μεθυλομάδες. (Manach C. et al, 2004).

Ανθοκυανιδίνες: βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (λάχανο, φασόλια, μελιτζάνα κ.α.) και ιδιαιτέρως στα φρούτα. (Clifford MN. 2000). Εντοπίζονται στον επιδερμικό ιστό των φυτών και προσδίδουν το ροζ, κόκκινο, μπλε και μωβ χρώμα. Κύρια εκπρόσωπος είναι η κυανιδίνη (Manach C. et al, 2004).

Φλαβανόλες: συνιστούν την πιο πολύπλοκη ομάδα των φλαβονοειδών, Υπάρχουν είτε ως μονομερή (κατεχίνη, επικατεχίνη) είτε ως πολυμερή (προανθοκυανιδίνες). Οι προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται και συμπυκνωμένες τανίνες, υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες έπειτα από κατεργασία με ισχυρά οξέα (Crozier A. et al., 2006). Εντοπίζονται σε πολλά φρούτα, στο κόκκινο κρασί, αλλά σημαντικότερες πηγές τους είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα.

1.3.2.2 Μη Φλαβονοειδή

Τα μη φλαβονοειδή μπορούμε να τα διακρίνουμε σε τρεις κύριες κατηγορίες:

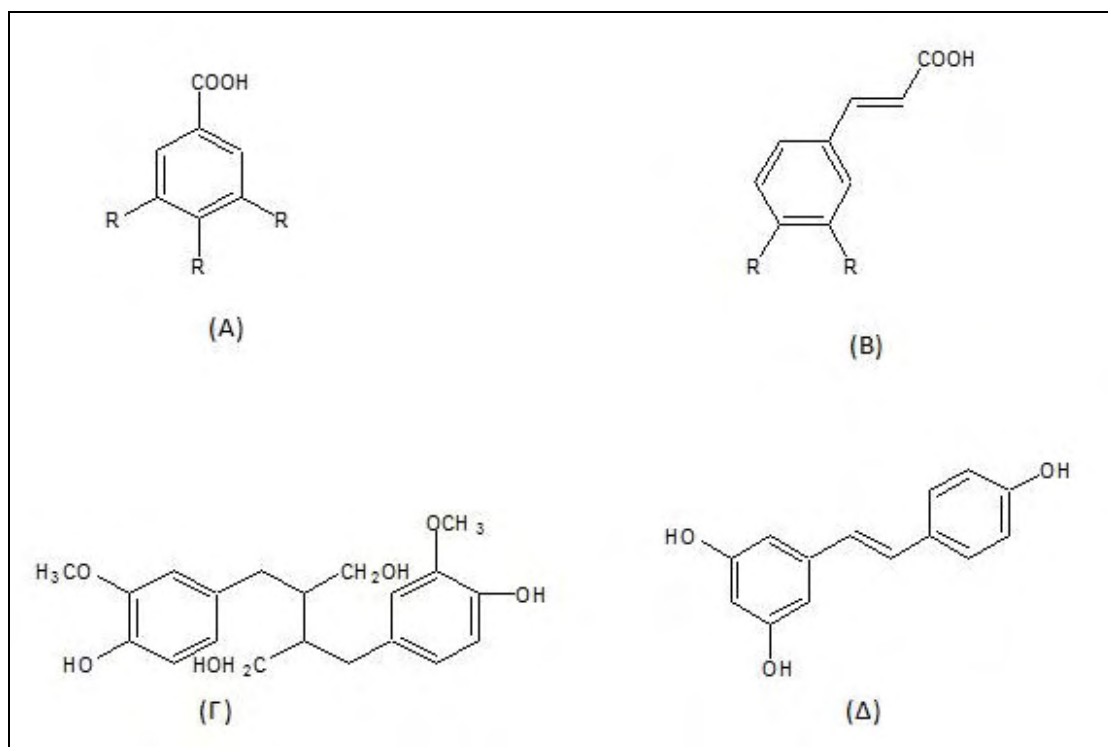
Φαινολικά οξέα: μπορούμε να τα διακρίνουμε στα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκιναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (εξάιρεση το τσάι) και αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών, όπως οι υδρολύμενες τανίνες (Clifford MN, Scalbert A., 2000). Χαρακτηριστικότερα βενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ.

Τα υδροξυκιναμικά οξέα συναντώνται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά. Συνήθως γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό, το σικιμικό και το ταρταρικό οξύ. Κυριότερα μέλη είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ. Είναι γνωστή η δράση του καφεϊκού οξέος, τόσο στην απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, όσο και στη δραστηριότητα της κασπάσης 3 από πολλές μελέτες. (Lee HJ et al., 2005).

Λιγνάμια: σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες, είναι συνήθως συνδεδεμένες με σάκχαρα και συναντώνται στα τρόφιμα σε μικρά ποσοστά. Μεταβολίζονται στο παχύ έντερο σε διάφορες ουσίες που δρουν ως αγωνιστές αλλά και ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ μικροποσότητες περιέχονται σε δημητριακά, φρούτα και λαχανικά (Adlercreutz H, Mazur W., 1997).

Στιλβένια: αποτελούν μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μια γέφυρα μεθυλενίου

και απαντάται κυρίως στα σταφύλια και στο κρασί (Bertelli A. et al., 1998). Έχει μελετηθεί εκτενώς εξαιτίας της πιθανής αντικαρκινικής της δράσης.



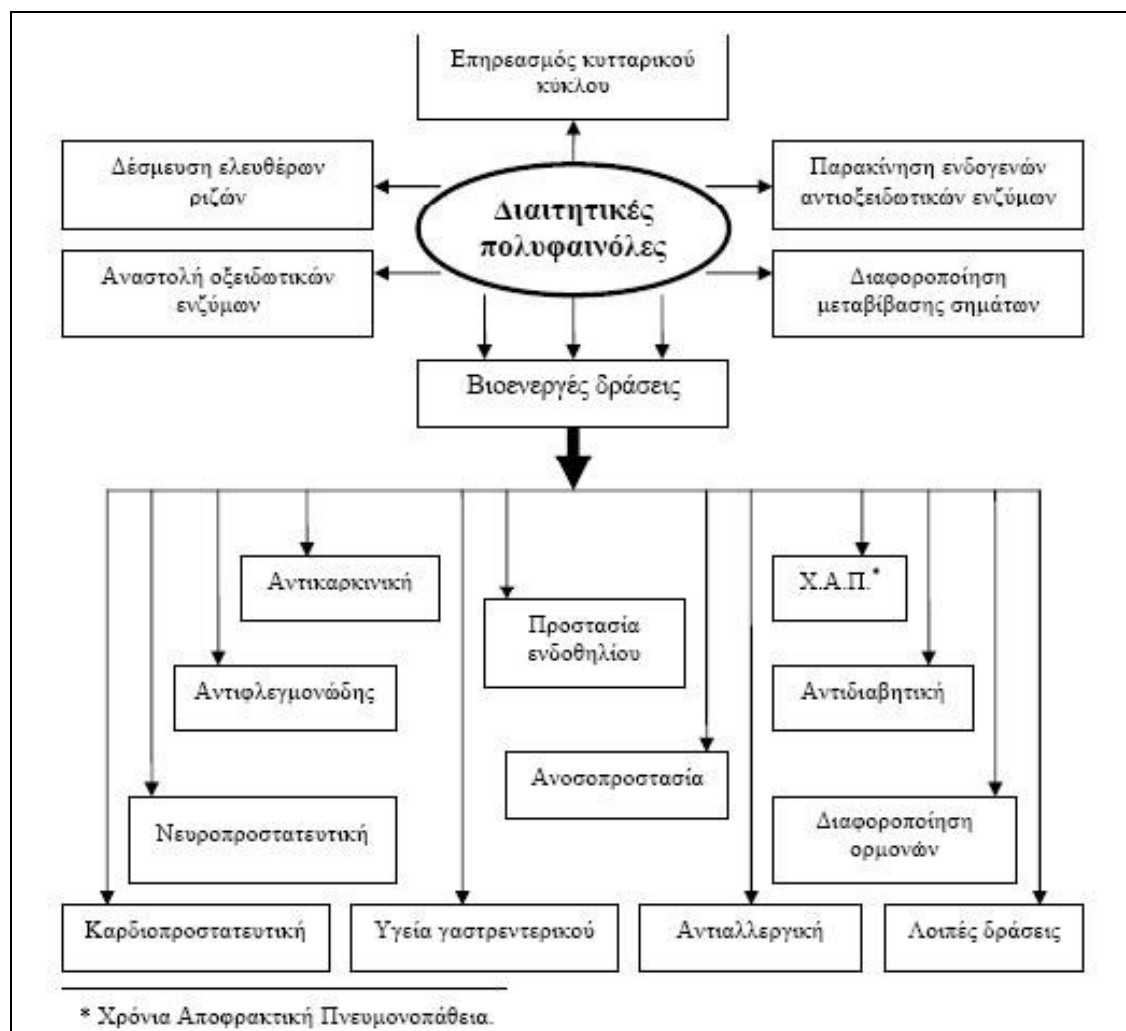
Εικόνα 9: Χημικές δομές πολυφαινολικών οξέων, στιλβενίων και λιγνανών. (Α) Υδροξυβενζοϊκά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Β) Υδροξυκινναμικά οξέα (πολυφαινολικά οξέα). (Γ). Σεκοϊσολαρισιρεσινόλη (λιγνάνη). (Δ) *trans*-ρεσβερατρόλη (στιλβένιο). R: θέσεις σύνδεσης υδροξυλομάδων ή άλλων πλευρικών ομάδων (Στάγκος Δ., 2006)

1.3.3 Βιολογικές ιδιότητες πολυφαινολών

Σε επίπεδο φυτικού οργανισμού, οι πολυφαινόλες θεωρούνται υπεύθυνες για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών, συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τους επικονιαστές, καθώς και στη διασπορά των σπερμάτων. Σύμφωνα με μελέτες συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, των περιβαλλοντικών πιέσεων και της προσβολής από παθογόνα. Ακόμη, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων (Manach C. et al, 2004, Di Carlo G. et al., 1999, Harborne J.B., 1986).

Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες και για τον ανθρώπινο οργανισμό (Dew et al., 2005). Τα

τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν συλλέξει ικανοποιητικό όγκο δεδομένων και έχουν καταλήξει, ότι οι πολυφαινόλες πράγματι μπορούν να δρουν ως παρεμποδιστές ασθενειών. Για το λόγο αυτό υπάρχει ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, λόγω των αντιοξειδωτικών και των χημειοπροστατευτικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία (Dew et al., 2005). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν, μεταξύ άλλων, την ευεργετική δράση των πολυφαινολών στις φλεγμονές, στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στην καρκινογένεση, στην οστεοπόρωση και πιθανότατα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και στο διαβήτη (Hertog et al, 1995, Tapiero et al, 2002, Scalbert et al, 2004, Han et al, 2007). Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται συνοπτικά οι βιολογικές δράσεις δαιτητικών πολυφαινολών:



Εικόνα 10: Βιολογικές δράσεις δαιτητικών πολυφαινολών (Han et al, 2007)

Αναλυτικότερα λοιπόν:

➤ Ως αντιοξειδωτικά οι πολυφαινόλες μπορούν να προστατεύσουν τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη. Ως εκ τούτου, μπορούν να περιορίσουν τον κίνδυνο των διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως οι καρδιαγγειακές νόσοι, ο διαβήτης τύπου II και ο καρκίνος (Scalbert A. et al, 2005).

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έγκεται στο γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να δρουν ως “δεσμευτές” ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η αντιοξειδωτική δράση τους εκδηλώνεται με προστασία της LDL από την οξείδωση, αλλά και με δράση έναντι οξειδωτικών παραγόντων του επιθηλικού ιστού, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και έτσι, να μειώνεται ο κίνδυνος καρδιοπαθειών (Halliweel, 1999, Χίου, 2006). Τα φαινολικά συστατικά διαθέτουν ιδανικές χημικές δομές για να “δεσμεύουν” τις ελεύθερες ρίζες και έχει αποδειχτεί *in vitro* ότι είναι πιο αποτελεσματικά ανιοξειδωτικά από τις βιταμίνες E και C (Rice-Evans et al, 1997). Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν και αναστέλλουν/διακόπτουν την οξείδωση μέσω ελευθέρων ριζών με 3 τρείς τρόπους (Χίου, 2006):

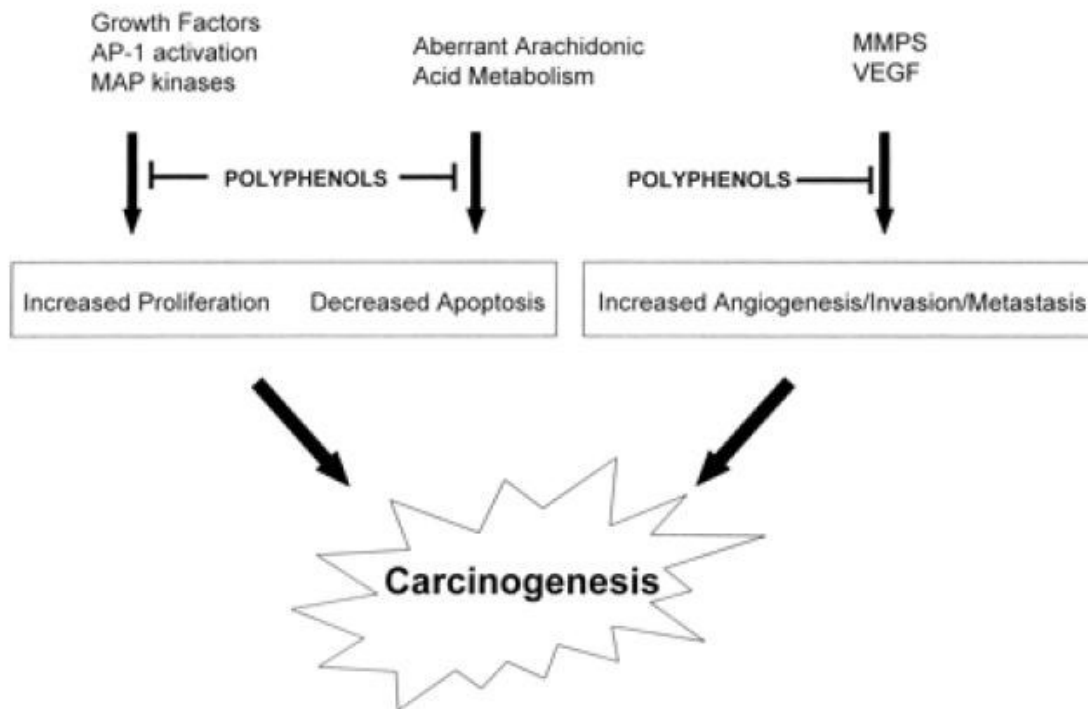
- i. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και τις εξουδετερώνουν. Μέσω αυτής της διαδικασίας καθίστανται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες όμως είναι πιο σταθερές ακριβώς λόγω της πολυφαινολικής δομής, η οποία μέσω συντονισμού σταθεροποιείται σημαντικά.
- ii. Δρουν ως δεσμευτές (κυρίως τα φλαβονοειδή) μεταλλικών ιόντων Fe, Cu, Zn, Na, Al, τα οποία συχνά είναι προκαλούν αντιδράσεις οξείδωσης. Αυτό γίνεται μέσω της δημιουργίας ενός χηλικού συμπλόκου με το μεταλλικό ιόν.
- iii. Αναγεννούν ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, τη βιταμίνη E.

➤ Άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι οι πολυφαινόλες, εκτός από την παρεμπόδιση της οξείδωσης της LDL, διαθέτουν πρόσθετες καρδιοπροστατευτικές λειτουργίες, όπως να τροποποιούν την ηπατική απορρόφηση χοληστερόλης, τη σύνθεση και έκκριση τριγλυκεριδίων και να επεξεργάζονται τις λιποπρωτεΐνες στο πλάσμα. Έτσι,

ο κίνδυνος καρδιαγγειακών νοσημάτων μειώνεται, βελτιώνοντας την περιεκτικότητα του πλάσματος σε λιπίδια και μειώνοντας τις φλεγμονές (Zern & Rernandez, 2005).

Τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά των φυσικών φυτικών τροφίμων, κυρίως φρούτων και λαχανικών, έχουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι της καρκινογένεσης, προστατεύοντας το DNA από τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, οι πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν την καρκινογένεση “μπλοκάροντας” συγκεκριμένες καρκινογενετικές οδούς και επηρεάζοντας τα μοριακά γεγονότα των σταδίων έναρξης, προώθησης και εξέλιξης (Halliwell, 1999, Urquiaga & Leighton, 2000, Stocket et al, 2004). Κατά τη Bravo (1998), πολλά είδη των πολυφαινολών (φαινολικά οξέα, υδρολυμένες ταννίνες, флаβονοειδή) δείχνουν αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες, παρεμβαίνοντας σε πολλά από τα βήματα που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων και αδρανοποιώντας τους καρκινογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση την έκφρασης της μετάλλαξης γονιδίων και τη δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων και ενζυματικών συστημάτων

Έτσι, κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης τους που εξηγούν τον χημειοπροστατευτικό τους ρόλο έναντι καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με την καταστολή της υπερέκφρασης των προ-οξειδωτικών ενζύμων, τη ρύθμιση της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF). Παράλληλα οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης, την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, αλλά και την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης. Η παρακάτω εικόνα δείχνει κάποιους από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς (Lambert et al, 2005).



Εικόνα 11: Μηχανισμοί παρεμπόδισης καρκινογένεσης από διαιτητικές πολυφαινόλες

- Σύμφωνα με τον Vita (2005), οι πολυφαινόλες επιδρούν θετικά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών ιστών. Έτσι εμφανίζουν αντιαλλεργικές ιδιότητες (παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων), αλλά και προστασία επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος.
- Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε ζώα ή ανθρώπινες κυτταρικές σειρές υποστηρίζουν το ρόλο των πολυφαινολών στην πρόληψη της οστεοπόρωσης (Scalbert A. et al, 2005).
- Ακόμη, παρατηρείται αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO.
- Επιπλέον, εμφανίζεται επίδραση των πολυφαινολών στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών. Κυρίως οι εκτενώς πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων), με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της απορρόφησης.

- Τέλος, οι πολυφαινόλες και κυρίως η τάξη των φλαβονοειδών παρουσιάζουν αντιθρομβωτικές και ανιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Gerritsen et al, 1995, Muldoon & Kritchevsky, 1996), ενώ τεκμηριωμένη φαίνεται να είναι και η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών συστατικών (Chung et al, 1998, Parkar et al, 2008).
- Αξίζει να σημειωθεί ότι η χαμηλή τοξικότητα και οι ελάχιστες παρενέργειες που συνδέονται με την κατανάλωση πολυφαινολών, αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματά τους έναντι των παραδοσιακών χημειοπροστατευτικών παραγόντων (Bode A.M. & Dong Z, 2006).

1.4 ROSACEAE

1.4.1 Η οικογένεια των Rosaceae

Η οικογένεια των *Rosaceae* ανήκει στην κλάση *Magnoliata*, υποκλάση *Rosidae*, και υπεριοικογένεια *Rosanae* (δικότυλα, αγγειόσπερμα) είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια, γνωστή και ως η οικογένεια των ρόδων, από ανθοφόρα φυτά και συμπεριλαμβάνει περίπου 2.830 είδη σε 95 γένη.

Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από το γένος της *Rosa*. Μεταξύ των πιο πλούσιων σε είδη γένη των *Rosaceae* είναι το *Alchemilla* (270 είδη), το *Sorbus* (260 είδη), το *Crataegus* (260 είδη), το *Cotoneaster* (260 είδη) , και το *Rubus* (250 είδη), αλλά το μεγαλύτερο γένος από όλα είναι το *Prunus* (περιλαμβάνει τις δαμασκηνιές, κερασιές, ροδακινιές, βερικοκιές και αμυγδαλιές) με περίπου 430 είδη .

Στο γένος *Prunus* εντάσσονται 80 είδη του Β. ημισφαιρίου, 10 της Ευρώπης και 5 είδη υπάρχουν στη χώρα μας: *S. aucuparia*, *S. domestica*, *S. torminalis*, *S. graeca*, & *S. Umbellata*. Ωστόσο, οι αριθμοί αυτοί είναι υποκειμενικοί και η ταξινόμηση της συγκεκριμένης οικογένειας χρειάζεται ακόμα πολλή δουλειά. (Potter D et al., 2007).

Τα φυτά της οικογένειας των *Rosaceae* μπορεί να είναι βότανα, θάμνοι ή δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα , αλλά μερικά είναι αιθαλή. Τα φυτά *Rosaceae* αν και μπορούν να βρεθούν σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης, ευημερούν κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο και σε περιοχές που δεν έχουν έρημο ή τροπικά δάση.

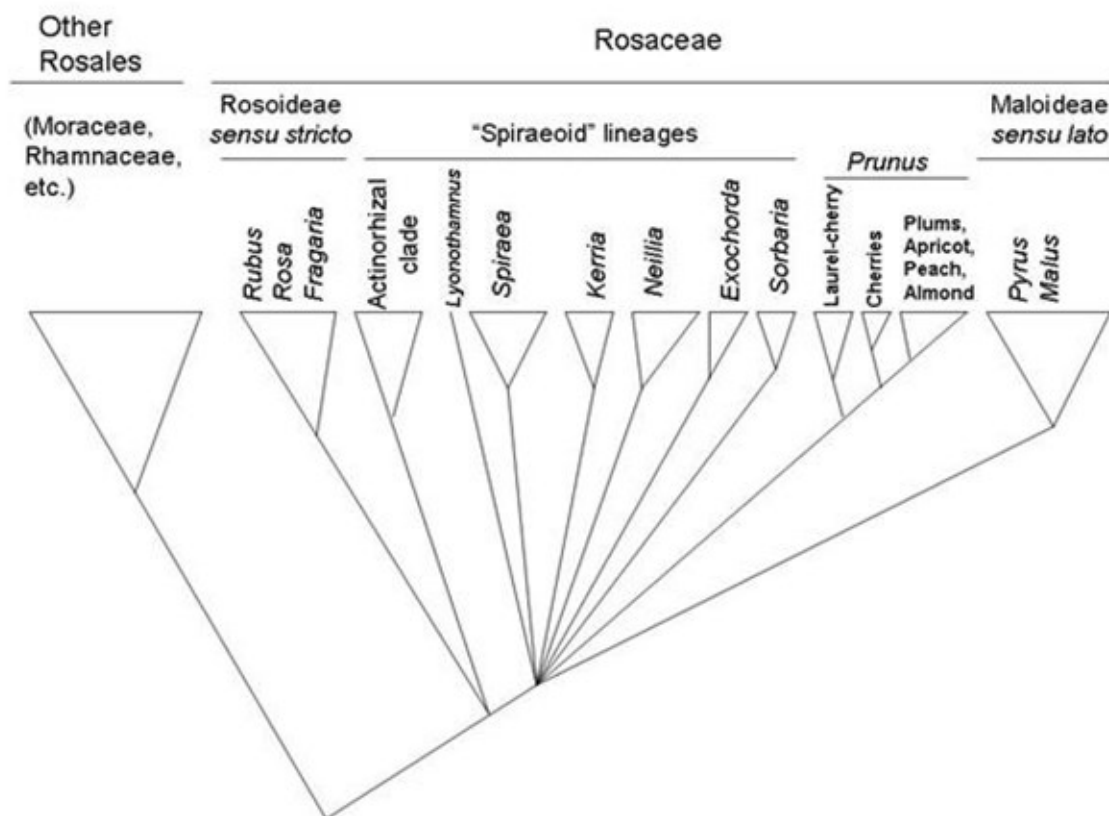
Πολλά οικονομικά σημαντικά προϊόντα προέρχονται από τα φυτά της οικογένειας *Rosaceae*, συμπεριλαμβανομένων πολλών βρώσιμων φρούτων (όπως

μήλα, αγλάδια, κυδώνια, βερίκοκα, δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βατόμουρα, μούσμουλα, και φράουλες), τα αμύγδαλα, και καλλωπιστικά δέντρων και θάμνοι (όπως τριαντάφυλλα και σορβιές) (Watson and Dallwitz, 1992). Επίσης, είδη των γενών *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Kerria*, *Photinia*, *Potentilla*, *Prunus*, *Pyracantha*, *Rhodotypos*, *Rosa*, *Sorbus* και *Spiraea* χρησιμοποιούνται κυρίως ως καλλωπιστικοί θάμνοι.

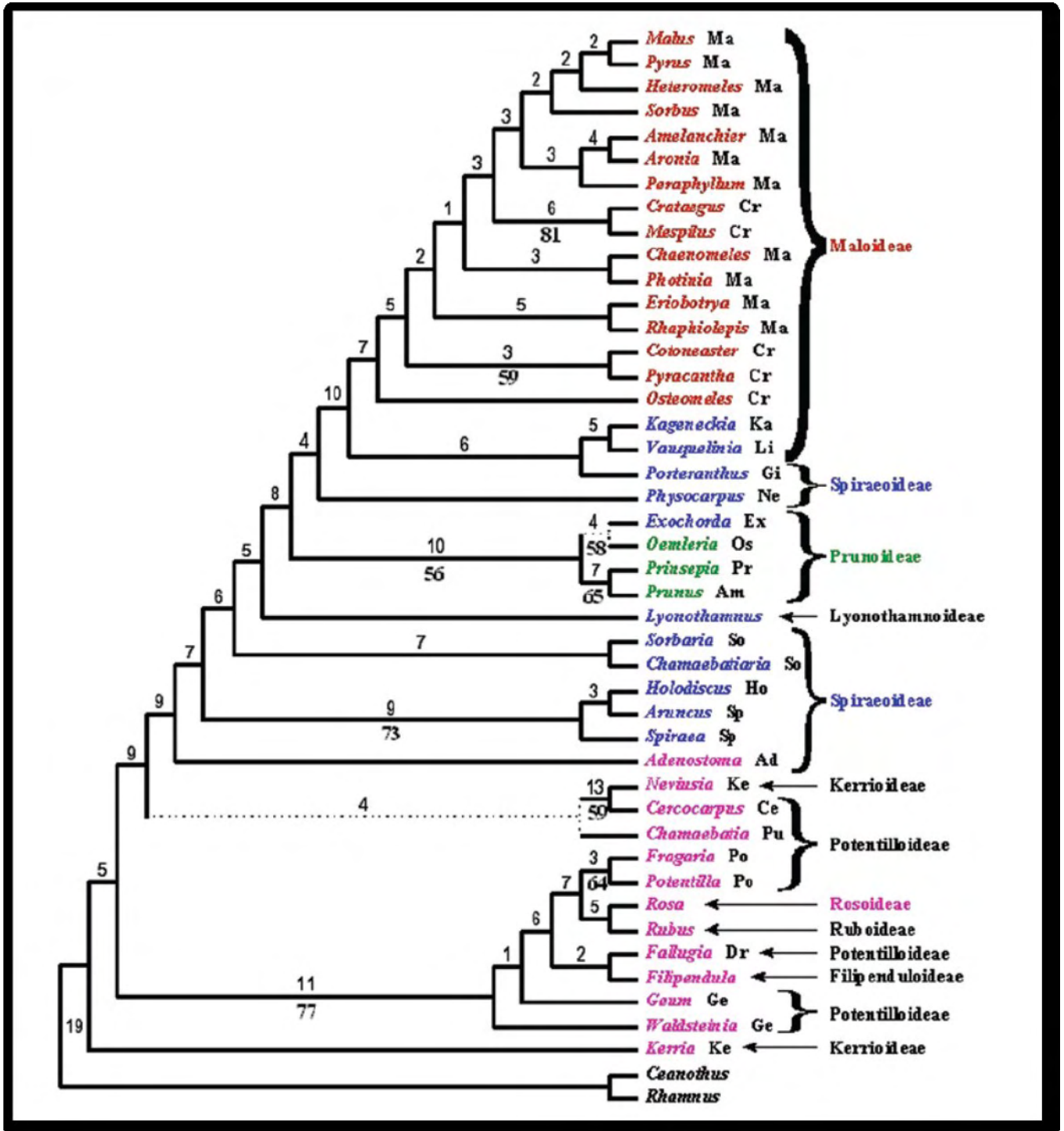
Από την άλλη πλευρά, κάποια από τα γένη αποτελούν επιβλαβή ζιζάνια σε ορισμένα μέρη του κόσμου, και για αυτό πρέπει να ελέγχονται. Αυτά τα φυτά μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποικιλομορφία των τοπικών οικοσυστημάτων μετά την καθιέρωσή τους. Τέτοια παρασιτικά είδη περιλαμβάνουν τα γένη *Acaena*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, και *Rosa*.

1.4.1.1 Ταξινόμηση των Rosaceae

Αν και αυτή η κατάταξη αμφισβητείται από πολλούς συγγραφείς (Kim E. Hummer and Jules Janick, 2009), η οικογένεια παραδοσιακά χωρίζεται σε 6 υποοικογένειες : *Rosoideae*, *Spiraeoideae* , *Maloideae* (*Pomoideae*), *Amygdaloideae* (*Prunoideae*), *Neuradoideae* και *Chrysobalanoideae*.



Εικόνα 12: Κλαδόγραμμα της οικογένειας *Rosaceae* σύμφωνα με την παραδοσιακή ταξινόμηση



Εικόνα 13: Φυλόγραμμα που παρουσιάζει την ταξινόμηση των φυτών της οικογένειας *Rosaceae*. Για την ταξινόμηση συνδυάστηκε η σύγκριση 125 χαρακτηριστικών (61 μη-μοριακών και 64 μοριακών)

(Dickinson et al. (2002). Τα χρώματα αναπαριστούν τις παραδοσιακά ταξινομημένες υποοικογένειες (κόκκινο=*maloideae*, μπλέ=*spiraeoideae*, πράσινο=*amygdaloideae*, ρόζ=*rosoideae*). Τα *Ceanothus* και *Rhamnus* αποτελούν την εξω-ομάδα.

Αν και η μοριακή ανάλυση συμφωνεί με παραδοσιακή ταξινόμηση στο γεγονός ότι η οικογένεια *Rosaceae* είναι σθεναρά μονοφυλετική, υπήρξε διαμάχη σχετικά με τις υπο-οικογένειες και τα είδη που περιλαμβάνουν. Έγινε γενετική ανάλυση για να εξεταστούν φυλλογενετικά τόσο η οικογένεια όσο και κάθε υποοικογένεια ξεχωριστά και τα μεγαλύτερα γένη. Ο Dickinson et al., 2002 δημιούργησε ένα φυλλόγραμμα διαφορετικό από τα ήδη υπάρχοντα. Για το σχηματισμό του, χρησιμοποίησε κλαδική ανάλυση από 125 χαρακτηριστικά που σχετίζονται τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά για τα μέλη της *Rosaceae* και πρόσθεσε αρκετά γένη στις *Maloideae*. Το γένος *Spiraeoideae* το χώρισε με τα *Amygdaloideae* (*Prunoideae*) και τα *Rosoideae* τα υποδιαίρεσε σε επιμέρους φύλα (Εικόνα 13).

Αν και η ταξινόμηση που έγινε από τον Dickinson et al για τα φυτά *Rosaceae* μπορεί να μην ισχύει από ταξινομική άποψη, αυτή η ομαδοποίηση εξακολουθεί να έχει μεγάλη χρησιμότητα από οικονομικής και γεωπονικής σκοπιάς. Η περαιτέρω μοριακή ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με μεθόδους της βιοπληροφορικής, μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τελική σωστή ταξινόμηση της οικογένειας *Rosaceae* (Kim E. Hummer and Jules Janick, 2009).

1.4.2 Φυτά της οικογένειας *Rosaceae* που εξετάζονται στην παρούσα εργασία

1.4.2.1 Εξετασθέντα φυτά του γένους *Prunus*

Prunus mahaleb

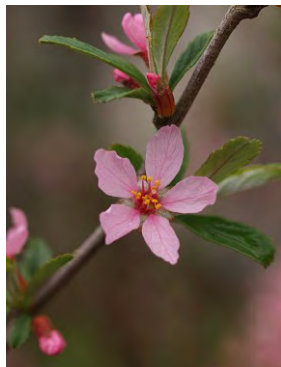


Εικόνα 14: Φυτό του γένους *Prunus mahaleb*

Πρόκειται για ένα είδος στο γένος *Prunus* που περιέχει περίπου 198 με 491 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Rosaceae*. Τα φυτά έχουν σχήμα θόλου και ευρεία διάδοση, φτάνουν σε ύψος τα 8 με 10 μέτρα και σε πλάτος τα 3 με 10 μέτρα. Ο φλοιός έχει χρώμα ασημί-γκρί με πράσινο. Είναι φυλλοβόλο και παράγει λευκά, αστεροειδούς τύπου λουλούδια τα οποία δίνουν καρπούς σε σχήμα τσαμπιών. Ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι το Μάιο και

εντοπίζεται σε Κεντρική και Νότια Ευρώπη, καθώς και στη Βόρεια Αμερική. Χρησιμοποιείται στην κοσμητική.

Prunus prostrata



Εικόνα 15: Φυτό του γένους *Prunus prostrata*

Ανήκει στο γένος *Prunus* με 198 με 421 είδη. Είναι θάμνος που έχει ύψος από 20 εκατοστά έως 1,5 μέτρα. Είναι φυλλοβόλο. Ανθίζει από Απρίλιο έως Μάιο και παράγει αστεροειδή ροζ άνθη. Εντοπίζεται στην βορειοδυτική Αφρική, στην Νότια Ευρώπη και στη Δυτική Ασία. Απαιτεί ηλιόλουστο περιβάλλον και υγρό χώμα και αντέχει έως τους -23°C.

Prunus webbii



Εικόνα 16: Φυτό του γένους *Prunus webbii*

Ανήκει στην οικογένεια *Rosaceae*. Το κοινό του όνομα είναι άγρια αμυγδαλιά και πρόκειται για δέντρο ή θάμνο ύψους μέχρι 8 μέτρα. Είναι άγριο φυτό και έχει αγκαθωτά κλαδιά που είναι ευρέως αποκλίνοντα. Τα φύλλα του έχουν διαστάσεις 3·5×0·9 εκατοστά, ενώ το σχήμα τους είναι επιμήκη – στενό και παρομοιάζεται με σχήμα λόγχης.

Το φύλλωμα του είναι παράλληλα τοποθετημένο, ενώ οι άκρες των φύλλων είναι στρογγυλεμένες ή αιχμηρές και δείχνουν προς τα εμπρός. Επίσης το φύλλωμα του έχει δόντια στο περιθώριό του και είναι άτριχο. Τα άνθη του έχουν μέγεθος 20 mm, έρχονται σε δυάδες ή μοναχικά, ενώ το χρώμα τους είναι σκούρο ροζ. Οι καρποί του έχουν μέγεθος 20-25 mm, είναι πικροί στη γεύση και ο πυρήνας του καρπού περιέχει υδροκυάνιο. Προτιμά τα βραχώδη μέρη και είναι διαδεδομένο σε όλη τη Μεσόγειο, αλλά κυρίως στη περιοχή της Κρήτης.

1.4.2.2 Εξετασθέντα φυτά του γένους *Pyracantha*

Pyracantha coccinea



Εικόνα 17: Φυτό του γένους *Pyracantha coccinea*

Πρόκειται για φυτό του γένους των Πυράκανθων (επιστημονική ονομασία: *Pyracantha*), είναι γένος μεγάλων αγκαθωτών αειθαλών θάμνων, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των Ροδοειδών. Είναι ενδημικά φυτά της Ασίας και της νοτιοανατολικής Ευρώπης. Φτάνει σε ύψος περίπου τα τέσσερα με έξι μέτρα. Έχει λευκά άνθη την άνοιξη και κόκκινους καρπούς, οι

οποίοι παραμένουν πάνω στο φυτό καθ' όλη τη διάρκεια του χειμώνα. Οι καρποί είναι μη τοξικοί και μπορούν να γίνουν μαρμελάδες, ζελέ και γλυκό αλλά είναι αδύνατο να καταναλωθούν ωμοί λόγω της πικρής γεύσης τους. Τα φύλλα είναι μικρά ωοειδή και έχουν κοντούς μίσχους. Είναι κοινό διακοσμητικό φυτό και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ψηλών και αδιαπέραστων φρακτών. Είναι ανθεκτικό στο ψύχος, την ξηρασία και τα ασβεστώδη εδάφη. Το είδος αυτό βρίσκεται κυρίως στην Ευρώπη και αποτελεί ένα καλλωπιστικό φυτό που καλλιεργείται στους κήπους από τον 16ο αιώνα.

1.4.2.3 Εξετασθέντα φυτά του γένους *Pyrus*

***Pyrus spinosa* (Γκορτσιά)**



Φυλλοβόλο, αγκαθωτό δέντρο, που φτάνει τα 6 μέτρα ύψος. Τα νεαρά κλαδιά στην αρχή έχουν λευκές τρίχες, αργότερα όμως είναι γυμνά. Τα φύλλα είναι πράσινα επάνω και γαλαζωπά κάτω. Τα άνθη είναι λευκά. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες θέσεις και απαντάται σε ξέφωτα δασών, περιθώρια χωραφιών και δίπλα σε δρόμους. Η γκορτσιά (κοινή ονομασία) είναι ένα παμπάλαιο ελληνικό δέντρο. Ο καρπός (γκόρτσι) είναι σφαιρικός με χρώμα κιτρινοκάστανο και αρκετά στυφός, που όμως γίνεται νοστιμότατο γλυκό. Εξαιρετικά

Εικόνα 18: Φυτό του γένους *Pyrus spinosa*

ανθεκτικό είδος, ανταπεξέρχεται πολύ καλά σε κάθε είδους υπόστρωμα, με προτίμηση σε pH ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο. Οι γνωστές φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι αιμοστατικές, κατά της δυσπεψίας, κατά της διάρροιας, ψυκτικές, αντισπασμωδικές, ευεργετικές στις παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και στην οδοντηρή δυσμηνόρροια. Γνωστά συστατικά και ουσίες του είναι τα εξής οξέα φρούτων: μαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, κουϊνικό οξύ, κυανογενικά γλυκοσίδια (αμυγδαλίνη), αρωματικές ουσίες, παράγωγα του καφεϊκού οξέος και κυρίως 5-κοφφεοϋλ-κουϊνικό οξύ, πηκτίνη.

1.4.2.4 Εξετασθέντα φυτά του γένους *Rosa*

Rosa arvensis



Εικόνα 19: Φυτό του γένους *Rosa arvensis*

Φυτό του γένους *Rosa*, το οποίο περιλαμβάνει 180 έως 623 είδη. Είναι θάμνος που φτάνει τα 2 μέτρα σε ύψος και πλάτος. Ο κορμός έχει πράσινο χρώμα. Είναι φυλλοβόλο και παράγει άσπρα αστεροειδή άνθη. Συναντάται σε όλη την Ευρώπη με εξαίρεση την Βόρεια Ευρώπη και την Τουρκία. Προτιμά ηλιόλουστο με ημισκιώδες περιβάλλον και χώμα με μέτρια υγρασία. Αντέχει σε θερμοκρασίες έως και -29°C. Χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία.

Rosa canina (Ροδή η κυνοροδή)



Εικόνα 20: Φυτό του γένους *Rosa canina*

Το βότανο *Rosa canina* ανήκει στην οικογένεια των Ροδοειδών. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες του φυτού. Τα αυτοφυή είδη στη χώρα μας υπολογίζονται σε 25 εκ των οποίων τα πιο αξιόλογα είναι η Αειθαλής (το κυνόσβατο του Διοσκουρίδη), η κανθοδεστάτη (η Ροδωνιά του Θεόφραστου), η Αρουραία, η Γαλλική, η Κυνοροδή και η Μόσχομος. Στην Ελλάδα το φυτό αυτό συναντάται με τις ονομασίες ροδαριά, κυνοροδή ή αγριοτριανταφυλλιά.

Είναι θεραπευτικό και μελισσοτροφικό φυτό. Χρησιμοποιείται και ως υποκείμενο της δενδροειδούς τριανταφυλλιάς. Είναι φυλλοβόλο και το ύψος του κυμαίνεται από 1-3 μέτρα. Έχει στελέχη τοξοειδή με κυρτά αγκάθια και φύλλα πτεροειδή με οδοντωτά φυλλάρια. Οι καρποί (κυνόροδα) είναι ωσειδείς, λείοι με χρώμα πορτοκαλί και κόκκινοι όταν ωριμάσουν. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, συνήθως με 5 σέπαλα, 5 πέταλα, ανοιχτού ρόδινου χρώματος (σπάνια λευκά ή κίτρινα), μυρωδάτα. Οι καρποί σχηματίζονται από την ανθοδόχη που καθίσταται σαρκώδης. Τους καρπούς τους χρησιμοποιούσαν εδώ και αιώνες ως ξινό φρούτο αλλά μόνο στη διάρκεια του δεύτερου παγκόσμιου πολέμου αναγνωρίστηκαν ως πλούσια πηγή βιταμίνης C. Τα φύλλα της αγριοτριανταφυλλιάς στο παρελθόν χρησιμοποιούνταν ως υποκατάστατο του τσαγιού καθώς και για την παρασκευή σιροπιών, ενώ τον πολτό των καρπών τον χρησιμοποιούσαν στα γλυκά. Οι καρποί είναι πολύ πλούσιοι σε βιταμίνη C. Περιέχουν επίσης βιταμίνες A, B και K, οργανικά οξέα, τανίνη και φλαβονοειδείς χρωστικές (βιταμίνη P), καροτινοειδή (προβιταμίνη A), πηκτίνη, φυτικά οξέα και έλαιο. Το βότανο του είναι θρεπτικό και δρα ως ήπιο υπακτικό, ήπιο διουρητικό και ήπιο στυπτικό. Τα κυνόροδα είναι μία από τις καλύτερες φυσικές πηγές της βιταμίνης C. Είναι χαρακτηριστικό ότι 3 καρποί του φυτού αντιστοιχούν με τη βιταμίνη που μας προσφέρει ένα πορτοκάλι. Βοηθούν στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και ιδιαίτερα στα κρυολογήματα. Υπάρχουν, επίσης, αναφορές που αναφέρουν ότι μειώνει την πίεση, αυξάνει την ελαστικότητα των αγγείων, διεγείρει την αιμοποίηση, αυξάνει τα λευκά αιμοσφαίρια και βελτιώνει την καρδιαγγειακή λειτουργία και έχει νευροπροστατευτική δράση. Είναι εξαιρετικό τονωτικό και βοηθά σε περιπτώσεις γενικής εξασθένησης και εξάντλησης.

Rosa sempervirens



Εικόνα 21: Φυτό του γένους *Rosa sempervirens*

Αποτελεί ένα φυτό που ενδημεί στους Μεσογειακούς θαμνότοπους και είναι γνωστό για τα λευκά του λουλούδια. Έχει λαμπερό φύλλωμα που αποτελείται από 3-5 φύλλα, τα οποία είναι ως επί το πλείστον αιθαλή. Πρόκειται για θάμνο που έχει αγκάθια. Τα φύλλα του μαραίνονται το χειμώνα αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν

στο φυτό. Τέλος αναφέρεται ότι ο καρπός του είναι ξηρός, σαρκώδης και δεν

σχίζεται κατά την ωρίμανση.

1.4.2.5 Εξετασθέντα φυτά του γένους *Sanguisorba*

Sanguisorba officinalis



Εικόνα 22: Φυτό του γένους *Sanguisorba officinalis*

Ανήκει στο γένος *Sanguisorba* που έχει 15 έως 39 είδη. Φτάνει σε ύψος τα 120 εκετοστά. Είναι φυλλοβόλο και τα άνθη του έχουν ραβδοειδές σχήμα και σκούρο κόκκινο χρώμα. Ανθίζει από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο. Εντοπίζεται σε όλη την Ευρώπη, στην Σιβηρία και στην κεντρική Ασία. Χρειάζεται ημισκιώδες περιβάλλον, υγρό χώμα και αντέχει σε θερμοκρασίες έως -35°C .

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά που ανήκουν στα γένη των *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*, της οικογένειας *Rosaceae*, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ΧΤΤ καθώς και η κυτταρομετρία ροής, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 9.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

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

2.1.2. Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

- i. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των HepG2 κυττάρων αποτελούνταν από τα εξής:
 - Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gilbo BRL 41966)
 - 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
 - Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
 - Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υλικά:

α) Θρεπτικό υλικό με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 25ml FBS
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- 250ml DMEM41966
- 2.5ml pen/str
- 2.5ml Γλουταμίνη

- ii. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)
- iii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- iv. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

- v. Εκχυλίσματα φυτών από τα γένη *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*

Στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκαν ακόμη:

- i. FACS Clean (Becton-Dickinson)
- ii. FACS Sheath (Becton-Dickinson)
- iii. FACS Rinse (Becton-Dickinson)
- iv. Χρωστική Απόπτωσης PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, (Becton-Dickinson)
- v. Απεσταγμένο νερό

2.1.3. Εκχυλίσματα

- vi. Τα εκχυλίσματα, που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από αρωματικά φυτά από τα γένη *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τα είδη των προαναφερθέντων φυτών που εξετάστηκαν ήταν τα παρακάτω (Πίνακας 1):

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα από τα γένη *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*

Αριθμός Δείγματος	Φυτικό εκχύλισμα
Δείγμα 1	<i>Prunus mahaleb</i>
Δείγμα 2	<i>Prunus prostrata</i>
Δείγμα 3	<i>Prunus webbii</i>
Δείγμα 4	<i>Pyracantha coccinea</i>
Δείγμα 5	<i>Pyrus spinosa</i>
Δείγμα 6	<i>Rosa arvensis</i>
Δείγμα 7	<i>Rosa canina</i>
Δείγμα 8	<i>Rosa sempervirens</i>
Δείγμα 9	<i>Sanguisorba officinalis</i>

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2

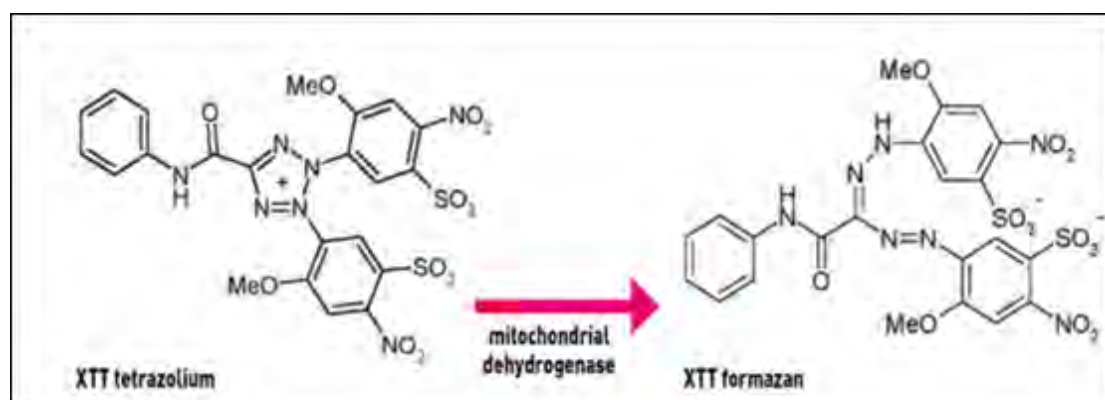
Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HepG2 σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 mL) το οποίο ήταν

εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε γινόταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split), αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 330 μL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 4 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό (5mL) με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

2.2.2. Προσδιορισμός της κυτταρικής αύξησης με τη μέθοδο XTT

2.2.2.1. Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.

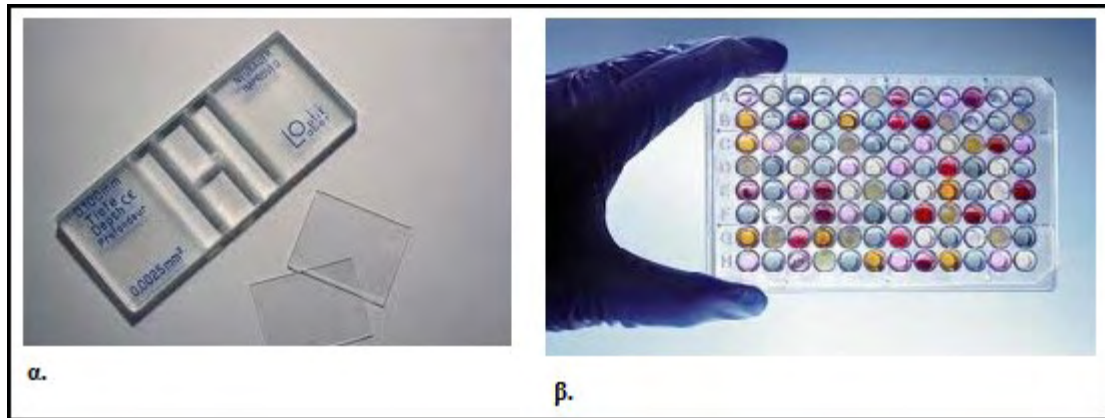


Εικόνα 23: Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

2.2.2.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προσθέτονταν 10000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προσθέτονταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στις φλάσκες καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τις εξεταζόμενες ουσίες) συνολικού όγκου 100μL. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη εκχυλισμάτων επώαζονταν για 24 ώρες. Μετά την επώαση προσθέτονταν 50 μL από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Σημειώνεται ότι το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιοριζόταν η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του κάθε εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των καρκινικών κυττάρων HepG2 υπολογίστηκε από τον τύπο:

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



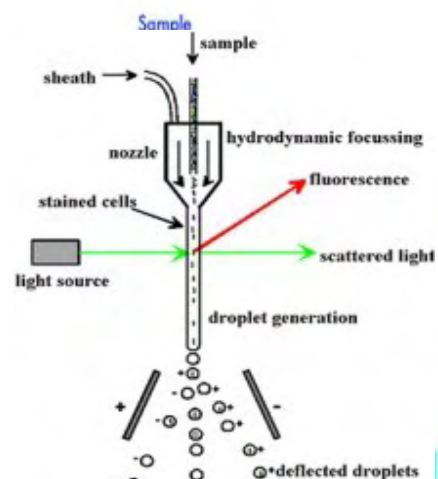
Εικόνα 24 : α) αντικειμενοφόρος πλάκα *Neubauer* και καλυπτρίδες
β) 96-well plate με έγχρωμα διαλύματα σε κάθε μία θέση του

2.2.3. Προσδιορισμός της κυτταρικής απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

2.2.3.1. Αρχή μεθόδου

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η κυτταρομετρία ροής. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη χρήση laser για την καταμέτρηση και τον διαχωρισμό των κυττάρων. Επιτρέπει την ταυτόχρονη πολύ-παραμετρική ανάλυση των φυσικών ή και χημικών χαρακτηριστικών χιλιάδων σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο. Όσον αφορά την αρχή της μεθόδου, μια δέσμη φωτός (συνήθως η δέσμη είναι laser) ενός μόνο μήκους κύματος οδηγείται πάνω στο υδροδυναμικό ρεύμα υγρού. Ένα πλήθος από ανιχνευτές στοχεύονται στο σημείο από το οποίο το ρεύμα διέρχεται μέσα από την δέσμη των ακτίνων. Ο πρώτος ανιχνευτής αφορά τον καθορισμό του μεγέθους του κυττάρου (Forward Scatter or FSC). Ο δεύτερος αφορά την κοκκίωση του κυττάρου, δηλαδή με άλλα λόγια την πολυπλοκότητά του (Side Scatter or SSC). Όσο πιο κοκκιωμένο είναι ένα κύτταρο, τόσο υψηλότερο θα εμφανίζεται το επίπεδο του SSC. Επιπλέον, εκτός από τις δυο αυτές βασικές παραμέτρους, το μηχάνημα της κυτταρομετρίας ροής είναι σε θέση να ανιχνεύσει και φθορίζοντες ανιχνευτές. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι και οι χρωστικές οι οποίες χρησιμοποιήσαμε DCF, Mercury Orange και της απόπτωσης (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I).

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής



Εικόνα 25: Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της κυτταρομετρίας

ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λ.π.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται (Ehemann et al., 2003). Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες

χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διαταταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απ'ευθείας σκεδαζόμενο φώς (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φώς (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο).

2.2.3.2. Συσκευές κυτταρομετρίας ροής

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων το δευτερόλεπτο, σε "πραγματικό χρόνο", και ορισμένες έχουν επιπλέον τη δυνατότητα ενεργού διαχωρισμού και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μοιάζει με ένα μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί να παράγει την εικόνα ενός κυττάρου, η κυτταρομετρία ροής παρέχει δεδομένα για τα χαρακτηριστικά ενός



Εικόνα 26: Κυτταρόμετρο Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

μεγάλου αριθμού κυττάρων σε λίγο χρόνο. Για την ανάλυση στερεών ιστών θα πρέπει πρώτα να παρασκευαστεί εναιώρημα απομονωμένων (όχι συσσωματικών) κυττάρων.

Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από 5 κύρια συστατικά μέρη:

- μία ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid) η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- ένα οπτικό σύστημα -συνήθως χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου)- υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό λέιζερ)- αερόψυκτα λέιζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488nm), ερυθρού-HeNe (633nm), πράσινο-HeNe, HeCd (υπεριώδες))- λέιζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες)- που παράγει φωτεινά σήματα
- έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion - ADC) - το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον Η/Υ
- ένα σύστημα ενίσχυσης - δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
- έναν Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων.

Τα σύγχρονα όργανα κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά λέιζερ και ανιχνευτές φθορισμού. Η αύξηση του αριθμού των λέιζερ και των ανιχνευτών φθορισμού επιτρέπει την πολλαπλή σήμανση με χρήση αντισωμάτων και συνεπώς δίνει τη δυνατότητα για πιο ακριβή ταυτοποίηση των πληθυσμών που αποτελούν το στόχο βάσει του φαινοτύπου των τελευταίων. Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφίσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων.



Εικόνα 27: Tube ανάλυσης δειγμάτων

2.2.3.3. Πειραματική διαδικασία

Ο έλεγχος της απόπτωσης έγινε για το ισχυρότερο εκ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν, σύμφωνα με τη



Εικόνα 28: Χωστικές απόπτωσης Annexin V, 7-AAD και Binding Buffer

μέθοδο XTT (*Sanguisorba officinalis*). Η μελέτη αυτή έγινε με τη βοήθεια των δύο χρωστικών Annexin και 7-AAD οι οποίες δρουν συνεργαστικά, επικαλύπτοντας η μια το αποτέλεσμα της άλλης. Αρχικά, φροντίσαμε να έχουμε ισόποση ποσότητα κυττάρων σε 5 φλάσκες. Η μία ήταν η φλάσκα-Control και οι υπόλοιπες ήταν οι φλάσκες στις οποίες γίνονταν η επώαση των κυττάρων με το προς εξέταση εκχύλισμα 1, 4, 12 και 24 ώρες. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξετάστηκε ήταν η ίδια για όλες τις χρονικές στιγμές και ήταν ίση με την τιμή IC50 του εκχυλίσματος. Ακολουθούσε αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες και μέτρηση της ποσότητας αυτών σε Neubauer. Έπειτα, γινόταν μεταφορά των κυττάρων σε falcon και πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση για 5min, στους 4° C σε 1750RCF. Ακολουθούν απόρριψη του υπερκείμενου και 2 διαδοχικές πλύσεις των κυττάρων με 2- 3ml PBS. Η φυγοκέντρηση μεταξύ των πλύσεων παραμένει ίδια (5min - 4° C - 1750RCF) και κάθε φορά γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων στο PBS. Μετά την τελευταία πλύση και την απόρριψη του υπερκείμενου, γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 1X BB, σε ποσότητα ανάλογη του πληθυσμού των κυττάρων (1ml/10⁶ κύτταρα). Στη συνέχεια, γινόταν μεταφορά 200 μl από τα επαναιωρημένα στο BB κύτταρα. Από την κάθε φλάσκα προέκυπταν 4 σωληνάκια, σε καθένα από τα οποία γίνονταν η προσθήκη των αντίστοιχων κάθε φορά χρωστικών:

- 1 για χρώση μόνο με Annexin (2,5μl)
- 1 για χρώση μόνο με 7-AAD (2,5μl)
- 1 για χρώση και με τις δύο χρωστικές
- 1 unstained

και ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι για 15min. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθούσε προσθήκη 400μl 1X BB σε κάθε σωληνάκι. Τότε τα tubes ήταν έτοιμα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο. Σημειώνουμε ότι καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας των δειγμάτων για ανάλυση, τα δείγματα διατηρούνταν στον πάγο.

2.2.4. Στατιστική ανάλυση

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός της αντικαρκινικής ικανότητας των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο του XTT

Στο πρώτο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετήθηκε η επίδραση 9 εκχυλισμάτων από φυτά που ανήκουν στα γένη *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba* στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ήπατος (HepG2). Τα εκχυλίσματα ήταν αρχικά σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS, ανάλογα της αρχικής τους ποσότητας. Η μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το XTT assay. Η χρονική διάρκεια επώασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική σειρά HepG2 ήταν σε κάθε περίπτωση 24 ώρες. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, καθώς αυξάνεται η δόση των εκχυλισμάτων, παρατηρείται αύξηση και της αναστολής στην αύξηση των κυττάρων. Οι τιμές IC₅₀ (τιμές στις οποίες πεθαίνει το 50% των κυττάρων) είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής κάθε εξεταζόμενου εκχυλίσματος. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της κυτταρικής, αύξησης που παρουσιάζει το εκάστοτε εκχύλισμα. Πιο συγκεκριμένα:

Μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω εκχυλισμάτων:

- *Εκχύλίσματα φυτών του γένους Prunus*

- *Εκχύλισμα Prunus mahaleb*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 100, 150, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 98% στα 400 µg/mL. IC₅₀=195 µg/mL.
- *Εκχύλισμα Prunus prostrata*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 300, 400 και 800 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% στα 800 µg/mL. IC₅₀=315 µg/mL.

- Εκχύλισμα *Prunus webbii*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 12,5, 25, 50, 100, 200, 300 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 77% στα 400 µg/mL. IC₅₀=220 µg/mL.

- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους Pyracantha***
 - Εκχύλισμα *Pyracantha coccinea* εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 25, 30, 50, 70, 100 και 200 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% στα 200 µg/mL. IC₅₀=76,5 µg/mL.

- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους Pyrus***
 - Εκχύλισμα *Pyrus spinosa*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% στα 400 µg/mL. IC₅₀=100 µg/mL.

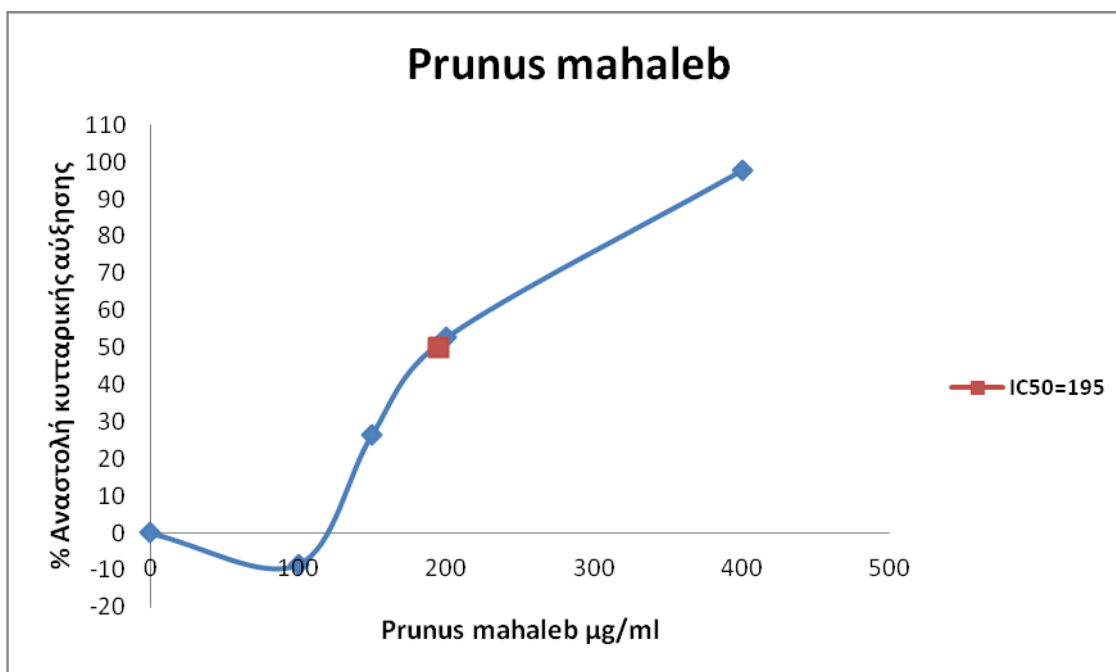
- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους Rosa***
 - Εκχύλισμα *Rosa arvensis*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 92% στα 400 µg/mL. IC₅₀=150 µg/mL.

 - Εκχύλισμα *Rosa canina*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 97% στα 400 µg/mL. IC₅₀=127 µg/mL.

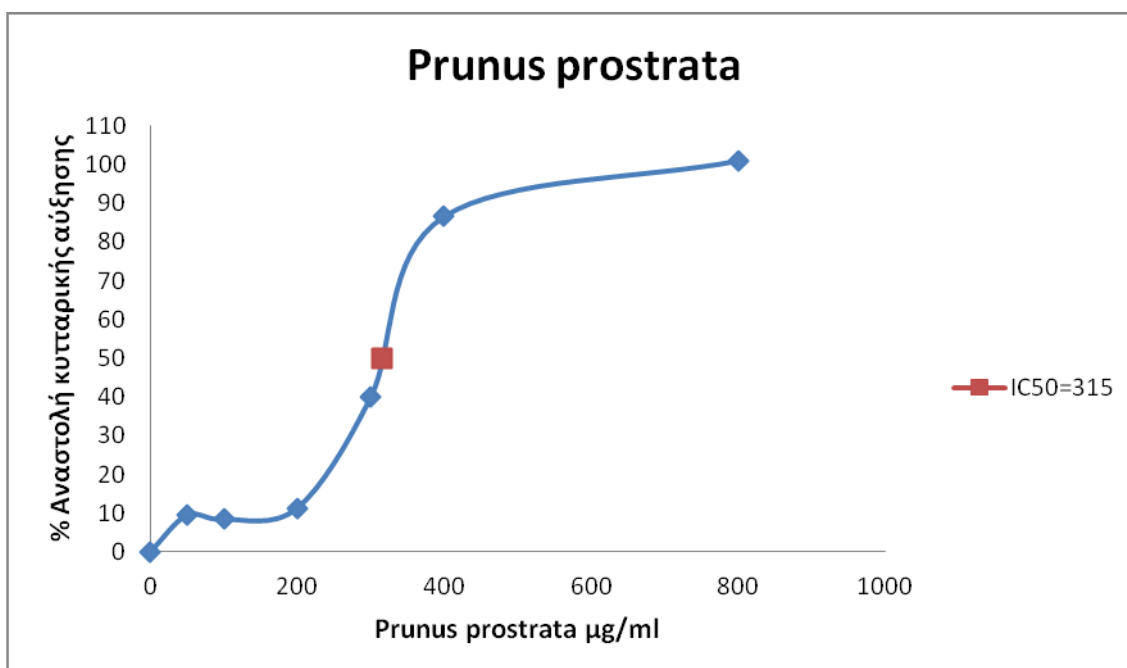
 - Εκχύλισμα *Rosa sempervirens*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% στα 400 µg/mL. IC₅₀=105 µg/mL.

- ***Εκχυλίσματα φυτών του γένους Sanguisorba***
 - Εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis*- εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 και 400 µg/mL και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100% στα 400 µg/mL. IC₅₀=42 µg/mL.

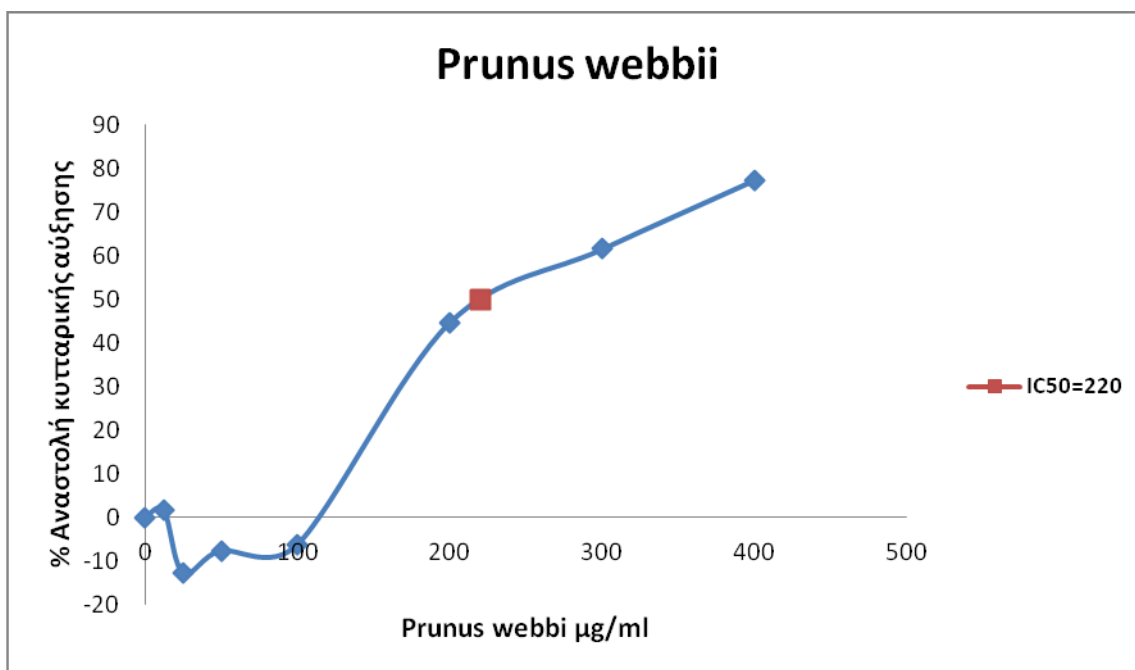
- Στο διάγραμμα 10 εμφανίζονται οι τιμές IC₅₀ που παρουσίασε το σύνολο των εξετασθέντων εκχυλισμάτων.



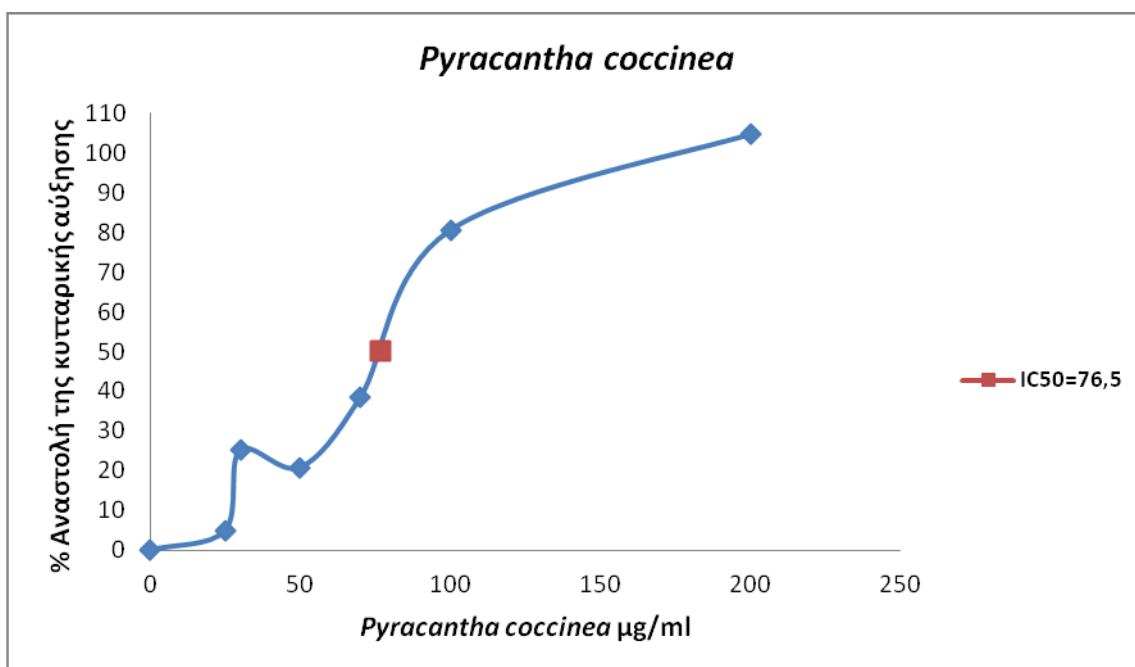
Γράφημα 1: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Prunus mahaleb*



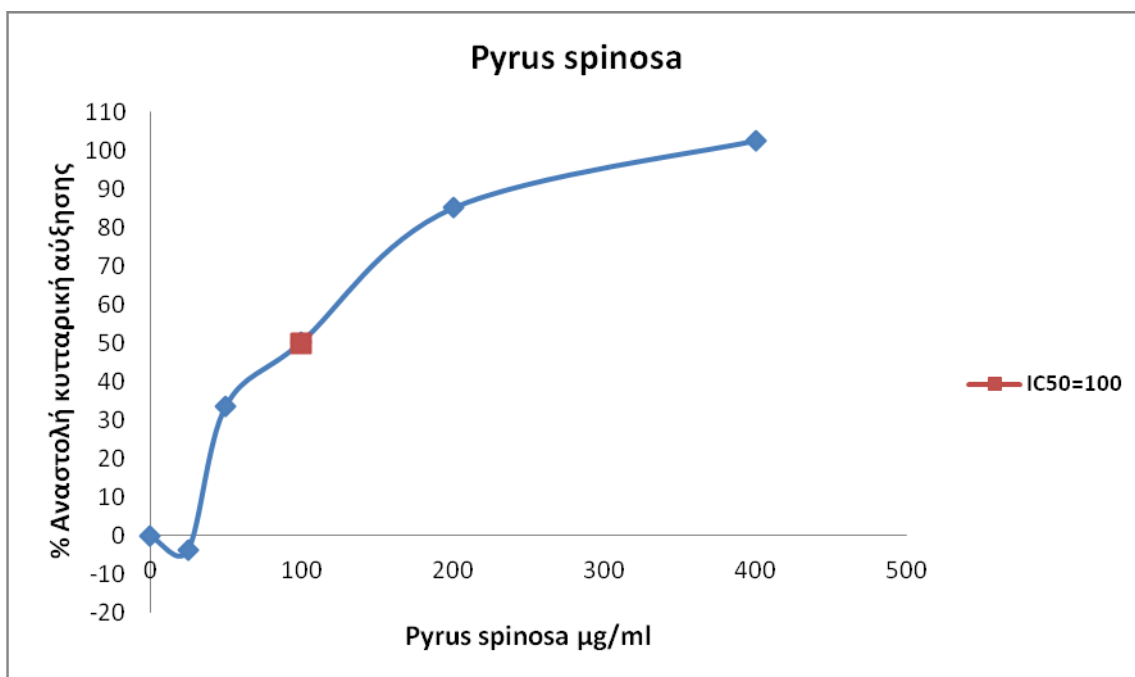
Γράφημα 2: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Prunus prostrata*



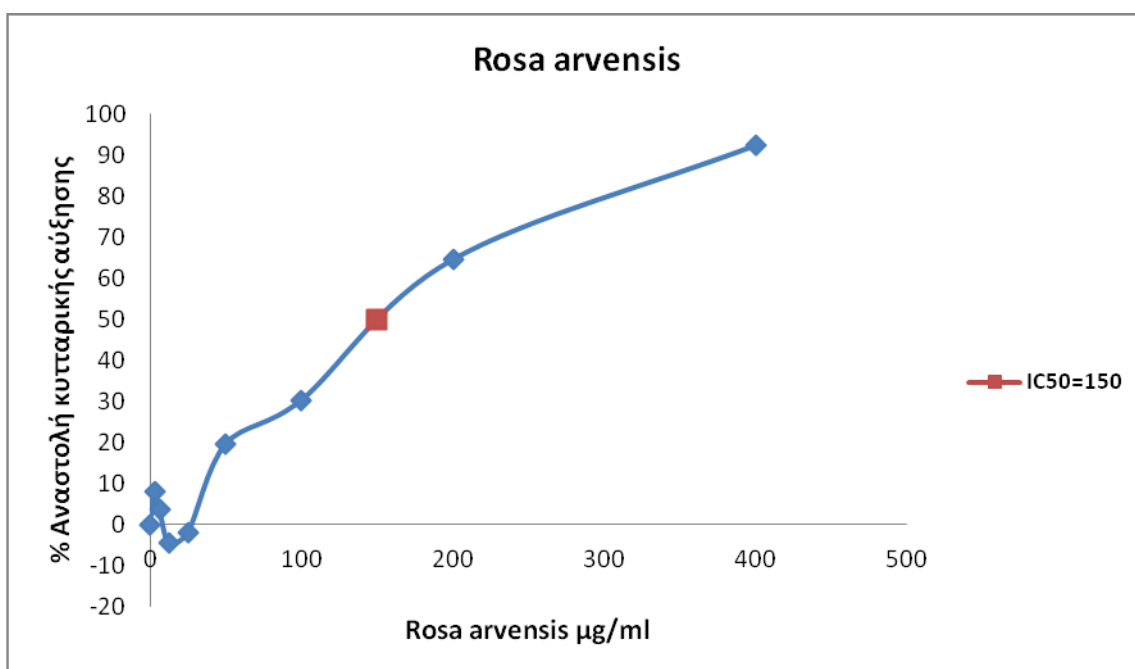
Γράφημα 3: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Prunus webbii*



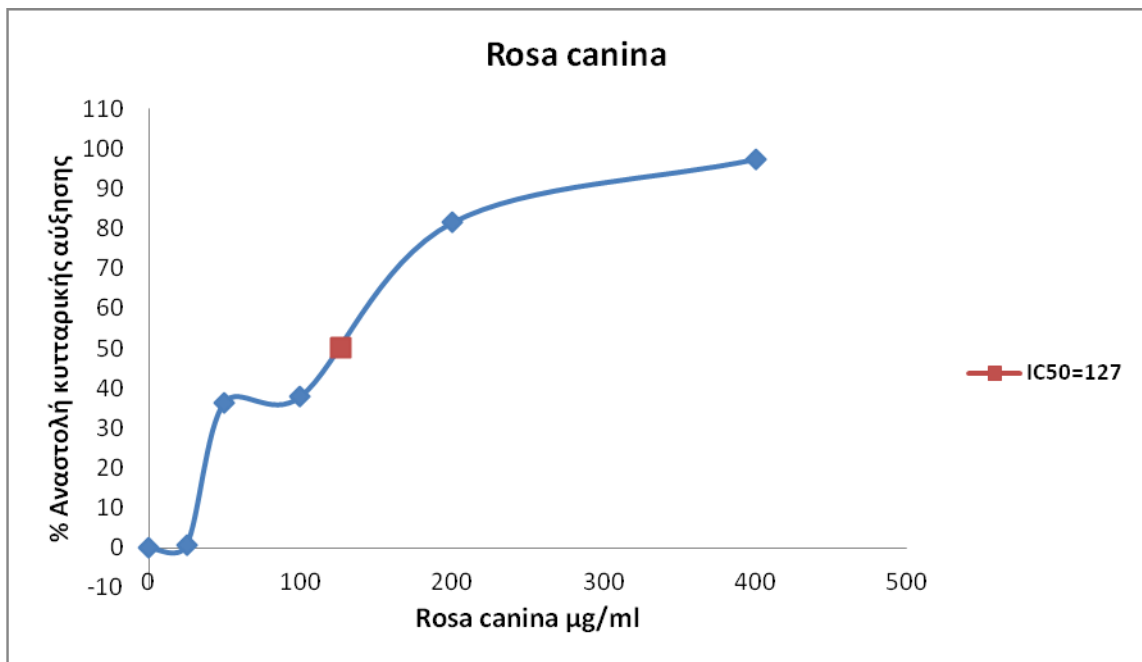
Γράφημα 4: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea*



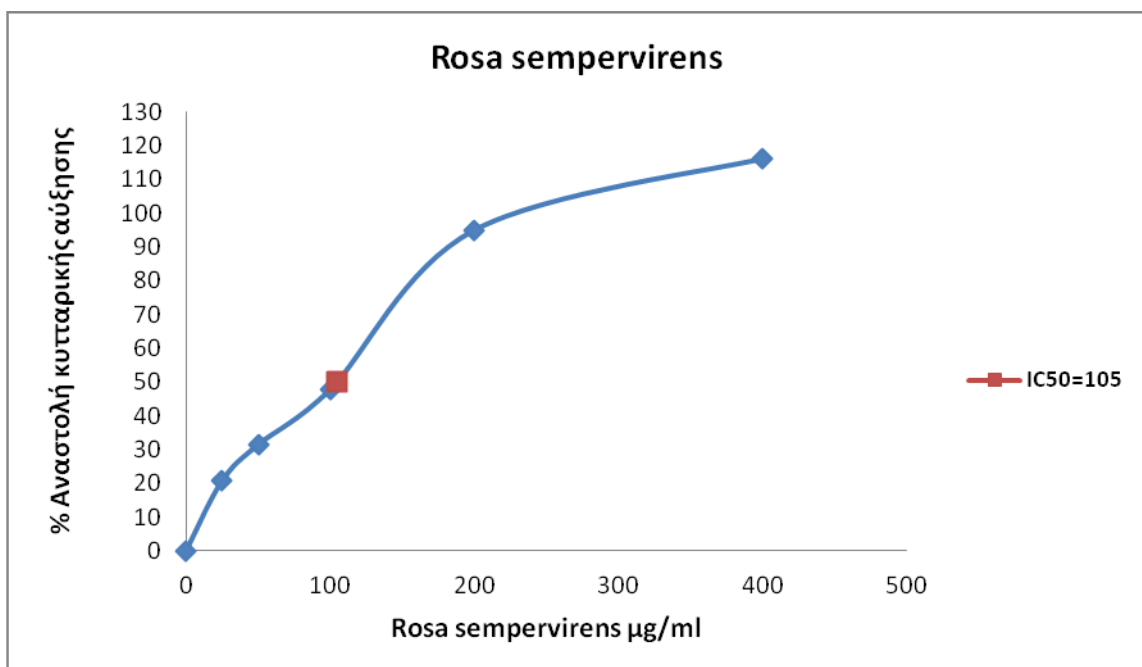
Γράφημα 5: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Pyrus spinosa*



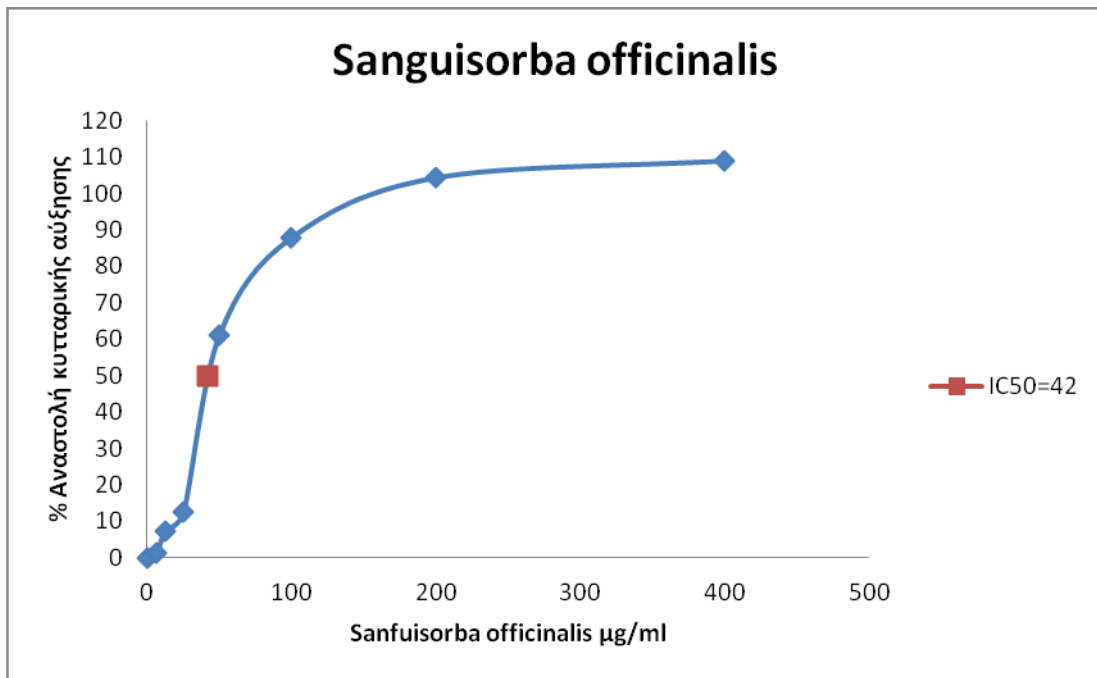
Γράφημα 6: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Rosa arvensis*



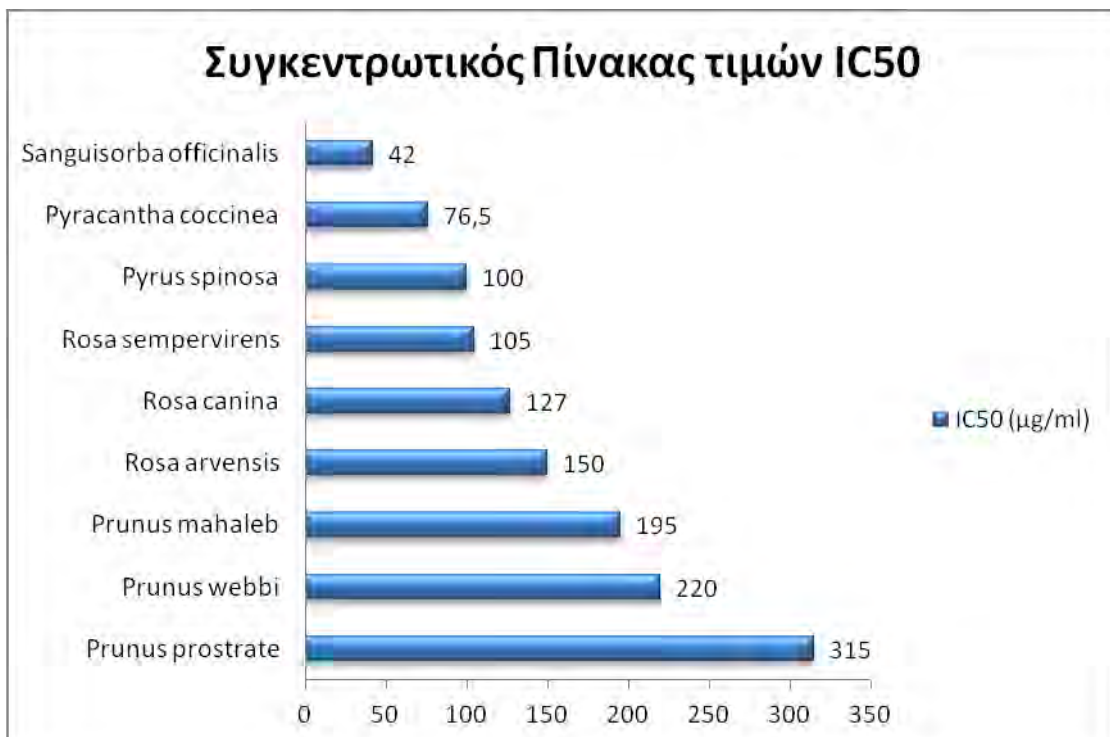
Γράφημα 7: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Rosa canina*



Γράφημα 8: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Rosa sempervirens*



Γράφημα 9: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των *HepG2* κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*



Γράφημα 10: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών IC_{50}

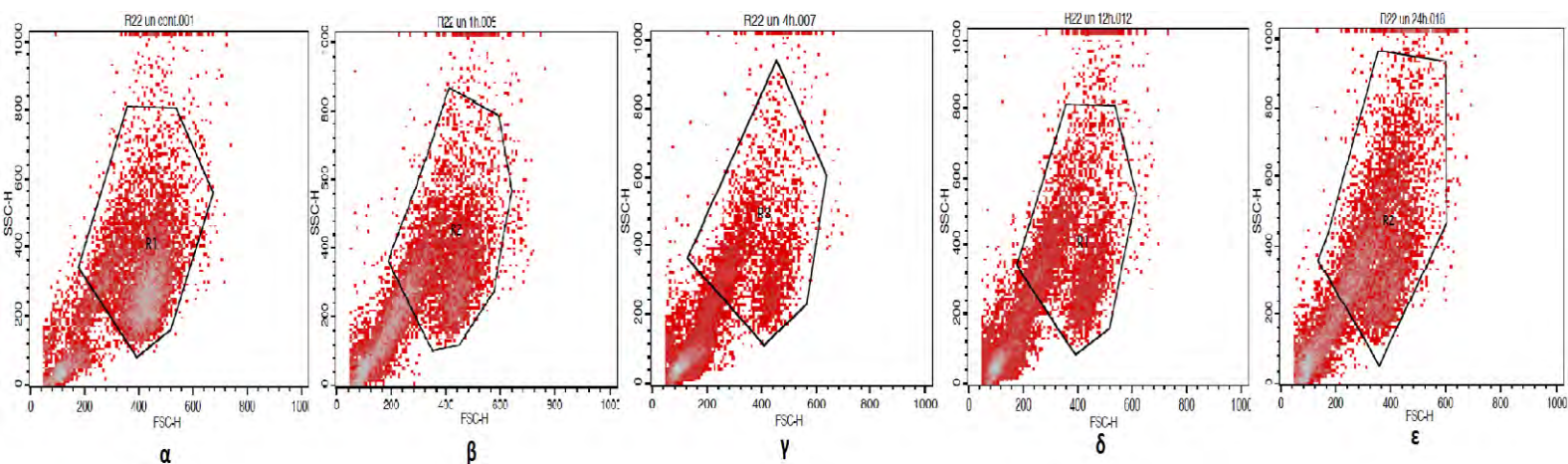
3.2 Προσδιορισμός πρόκλησης απόπτωσης από το ισχυρότερο εξεταζόμενο εκχύλισμα σε καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2), σε συνάρτηση με το χρόνο με κυτταρομετρία ροής

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η πρόκληση της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα HepG2 από το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis*, σε συνάρτηση με το χρόνο. Ο έλεγχος της δράσης του εκχυλίσματος έγινε μετά από επώαση των κυττάρων για 0, 1, 4, 12 και 24 ώρες. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα επιλέχθηκε καθώς ήταν το πιο ισχυρό μεταξύ των εξεταζόμενων, όσον αφορά την αντικαρκινική του ικανότητα. Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που επιλέχθηκε προς εξέταση ήταν ίση με την τιμή IC₅₀ που εμφάνισε. Η διαδικασία του πειράματος έγινε σε έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και την ορθότητα των συμπερασμάτων.

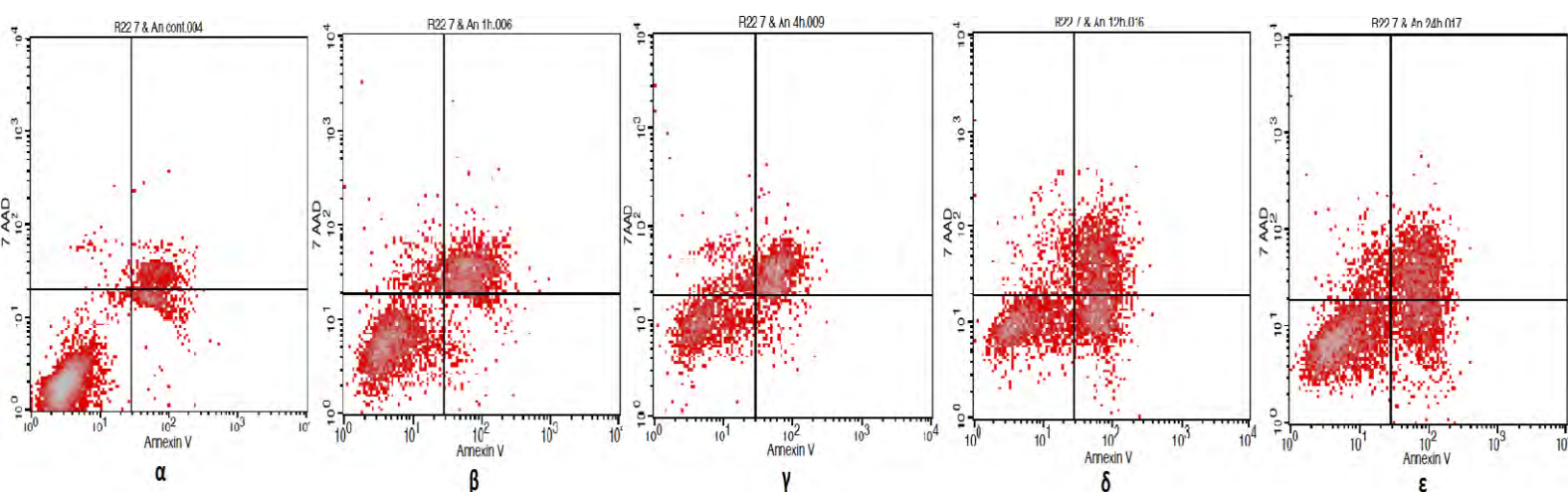
Στο Γράφημα 11 απεικονίζεται η πρόκληση της απόπτωσης από την επίδραση του εκχυλίσματος *Sanguisorba officinalis* σε συνάρτηση με το χρόνο. Σημαντική είναι όπως απεικονίζεται η πτώση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων του πληθυσμού, η οποία συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων. Το φαινόμενο ολοκληρώνεται με τη σταδιακή αύξηση τόσο των προ-αποπτωτικών όσο και των νεκρωτικών κυττάρων. Η μετατροπή του πληθυσμιακού ποσοστού των κυττάρων από ζωντανά σε αποπτωτικά, προ-αποπτωτικά και νεκρωτικά γίνεται εμφανής ήδη μετά την πρώτη ώρα δράσης του εκχυλίσματος. Κατά τη διάρκεια εξέλιξης του φαινομένου, το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων τροποποιείται από το αρχικό 83,3% επί του κυτταρικού πληθυσμού καθώς μειώνεται σε 45,4%, 40,1%, 34,37%, 41,6% μετά από 1, 4, 12 και 24 ώρες επώασης με το εκχύλισμα αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση στο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων καθώς αυτό αυξάνεται από το 7,4% του αρχικού πληθυσμού, χωρίς τη δράση του εκχυλίσματος, σε 30,6%, 39,3%, 39% και 41,5% έπειτα από αντίστοιχα 1, 4, 12 και 24 ώρες δράσης του εκχυλίσματος. Από την πλευρά τους, το ποσοστά των προ-αποπτωτικών κυττάρων στα κύτταρα μάρτυρες ήταν το 10,27% του κυτταρικού πληθυσμού σε ένα ποσοστό 9,02%. Μετά την επώαση για 1, 4, 12 και 24 ώρες με το εκχύλισμα τα ποσοστά τους ήταν 9,02%, 10,08%, 25,97% και 20,08% αντίστοιχα. Οι αυξομειώσεις αυτές που παρατηρούνται συνδυάζονται με τη συνεχή μείωση των ζωντανών κυττάρων και την αύξηση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων του HepG2 πληθυσμού. Το ποσοστό του νεκρωτικού λοιπόν πληθυσμού, που αρχικά αντιστοιχούσε στο 0,25% του συνόλου

των κυττάρων αυξήθηκε σε 3,43%, 6,45%, 7,13% και 7,13% μετά από επώαση για 1, 4, 12 και 24 ώρες με το εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*.

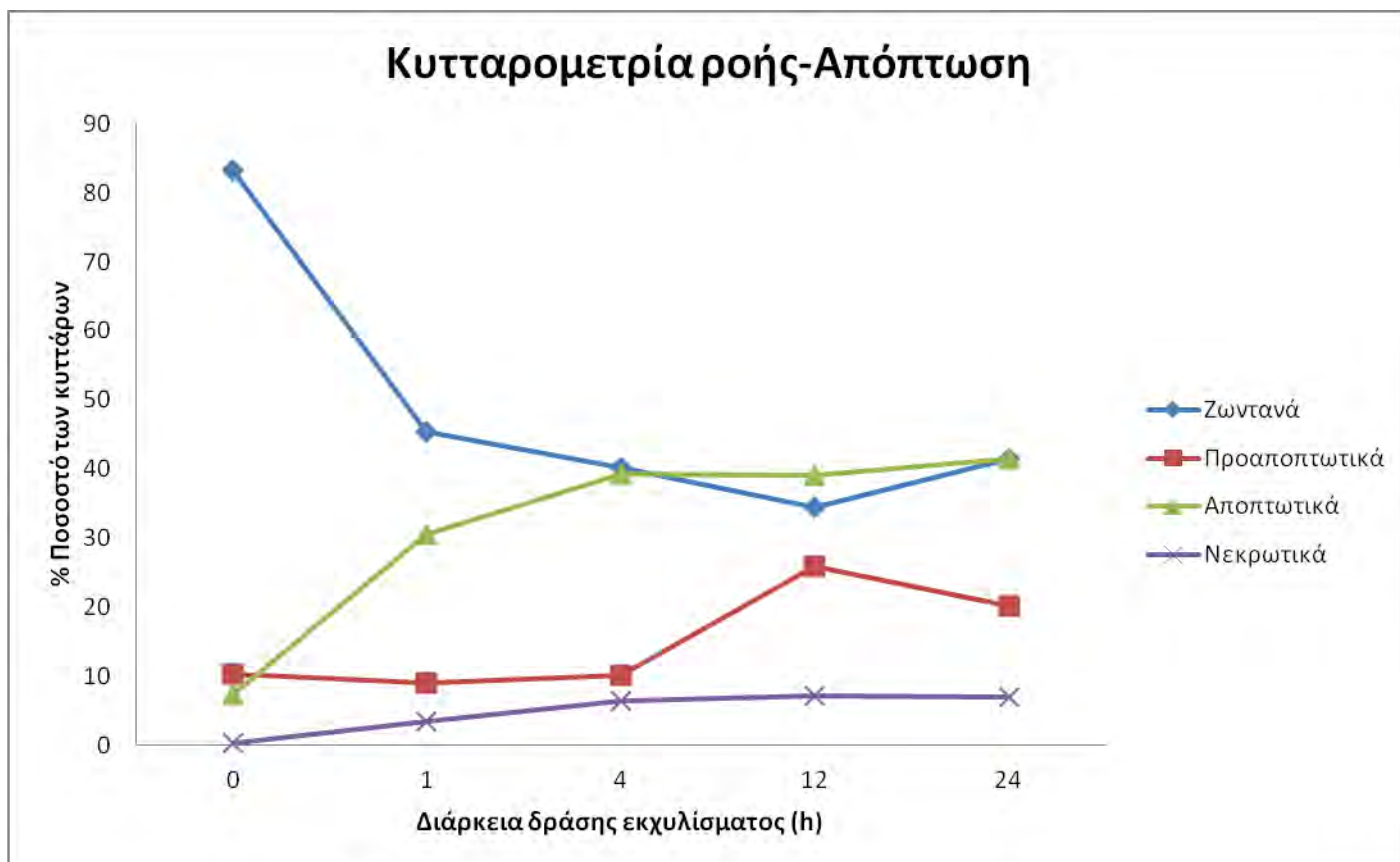
Στις εικόνες 29 και 30 δίνονται κάποια αντιπροσωπευτικά διαγράμματα του λογισμικού της κυτταρομετρίας ροής, τα οποία απεικονίζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά του HepG2 κυτταρικού πληθυσμού που μελετήθηκε καθώς και το πλήθος των κυττάρων που αντέδρασαν με τις χρωστικές της απόπτωσης (Annexin V και 7-AAD). Στην εικόνα 29, παρατηρείται η σταδιακή μείωση του μεγέθους του πληθυσμού έως και τις 12 ώρες, που οφείλεται στην κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος. Στην εικόνα 30, με το πέρασμα του χρόνου παρατηρείται μια σταδιακή μετακίνηση του πληθυσμού από το κάτω αριστερό τεταρτημόριο προς το κάτω δεξιά, πάνω δεξιά και τέλος πάνω αριστερά που μας δείχνει την εξέλιξη του φαινομένου της απόπτωσης και πως τα κύτταρα από ζωντανά μετατρέπονται σε προ-αποπτωτικά, σε αποπτωτικά και τέλος σε νεκρωτικά αντίστοιχα μετά την επώαση με το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis*.



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της κοκκίωσης (SSC) και του μέγεθος (FSC) των HepG2 κυττάρων που επωάστηκαν με το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis* σε συγκέντρωση 42μg/ml, κατά α)0, β)1, γ)4, δ)12 και ε)24 ώρες



Εικόνα 30: Αντιπροσωπευτικές εικόνες της μελέτης της απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με Annexin V και 7AAD των HepG2 κυττάρων που επωάστηκαν με το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis* σε συγκέντρωση 42μg/ml, για α)0, β)1, γ)4, δ)12 και ε)24 ώρες. Κάθε τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει μια διαφορετική κατάσταση των κυττάρων. Το κάτω αριστερά τεταρτημόριο αντιπροσωπεύει τα ζωντανά κύτταρα του πληθυσμού, το κάτω δεξιά τα προ-αποπτωτικά κύτταρα του πληθυσμού, το πάνω δεξιά τα αποπτωτικά κύτταρα και τέλος το πάνω αριστερά τα νεκρωτικά κύτταρα.



Γράφημα 11: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Λόγω του ότι οι θεραπείες για τον καρκίνο του ήπατος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, καθώς και εξαιτίας της μεγάλης συχνότητας επανεμφάνισής του μετά από θεραπεία, αναζητούνται νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή του, όπως η χημειοπροφύλαξη, καθώς και νέα αντικαρκινικά φάρμακα.

Ο όρος χημειοπροφύλαξη χρησιμοποιείται στην παρατηρούμενη πρόληψη, αναστολή ή αντιστροφή της καρκινογενετικής διαδικασίας με τη χορήγηση ενός ή περισσοτέρων χημικών ενώσεων, είτε με τη μορφή φαρμάκου είτε με τη διατροφή με τα φυσικά συστατικά των τροφών. Η στρατηγική χημειοπροστασίας του καρκίνου έχει διπλό στόχο: την αρχική πρόληψη του καρκίνου πριν την εμφάνισή του (primary prevention) και την έγκαιρη ανίχνευση, αναστροφή και περαιτέρω αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (secondary prevention) (De Flora et al., 2001, Smith et al., 2005). Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροφυλακτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια και ιδιαίτερη βάση έχει δοθεί στην χημειοπροστατευτική δράση των πολυφαινολών που προσλαμβάνουμε μέσω της διατροφής μας. Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων και έχουν σημαντικές αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Crozier et al., 2009). Υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα βότανα, τα ψυχανθή, τα χειλανθή, τα δημητριακά, το τσάι, το κόκκινο κρασί κ.α. και φαίνεται να δρουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αγγειογένεση και την μετάσταση (Bidlack et al., 2000).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά που ανήκουν στα γένη των *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*, της οικογένειας Rosaceae, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT καθώς και η κυτταρομετρία ροής, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 9.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης εξετάστηκαν 3 εκχυλίσματα, από είδη του γένους *Prunus* (*Prunus mahaleb*, *Prunus prostrata*, *Prunus webbii*), 1 εκχύλισμα από είδη του γένους *Pyracantha* (*Pyracantha coccinea*), 1 εκχύλισμα του γένους *Pyrus* (*Pyrus spinosa*), 3 εκχυλίσματα του γένους *Rosa* (*Rosa arvensis*, *Rosa canina*, *Rosa sempervirens*) και 1 εκχύλισμα του γένους *Sanguisorba* (*Sanguisorba officinalis*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2, με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 42 έως 315 µg/mL, επιβεβαιώνοντας τον χαρακτηρισμό τους σαν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. εφόσον σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φυτικά εκχυλίσματα με τιμές IC₅₀ από έως 1000 µg/mL, εμφανίζουν αρκετά ισχυρή αντικαρκινική δράση (Gad-Shayne C, 2009). Ταυτόχρονα, όπως παρατηρείται στα Γραφήματα 1 – 9 η αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων HepG2 που εξετάστηκαν εμφανίζεται να είναι κατά βάσει δοσοεξαρτώμενη, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που χορηγούνταν στα υπό εξέταση κύτταρα τόσο αυξάνεται και η αναστολή που παρουσιάζεται σε αυτά.

Από τα παραπάνω, σύμφωνα με το Γράφημα 10, την πιο ισχυρή δράση (μικρότερη τιμή IC₅₀) εμφάνισε το εκχύλισμα των *Sanguisorba officinalis* με τιμή IC₅₀=42 µg/ml και ακολούθησε το εκχύλισμα του *Pyracantha coccinea* με τιμή IC₅₀=76,5 µg/ml. Αντίθετα, η ασθενέστερες δράσεις φαίνεται να προκαλούνται από τα εκχύλιστα του *Prunus prostrata* και *Prunus webbii* με τιμή IC₅₀= 315µg/ml και IC₅₀= 220µg/ml αντιστοίχως.

Το δεύτερο μέρος της μελέτης αυτής περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της πρόκλησης απόπτωσης από το ισχυρότερο υπό εξέταση εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis* στη συγκέντρωση IC₅₀=42 µg/ml σε καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2), σε συνάρτηση με το χρόνο (0, 1, 4, 12 και 24 ώρες), με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Από τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό τόσο από *in vitro* όσο και από *in vivo* μελέτες (Sun et al, 2004, Galati et al, 2000), ότι η σημαντικότερη χημειοπροστατευτική ιδιότητα των πολυφαινολικών ενώσεων είναι η ικανότητα τους να επάγουν την απόπτωση (Ramos, 2007, Sun et al, 2004). Τα αποτελέσματα του Γραφήματος 11 εμφανίζουν μια σημαντική πτώση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων του πληθυσμού κατά τις τρεις πρώτες χρονικές στιγμές επώασης σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (από 83,3% στα κύτταρα μάρτυρες το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μειώθηκε σε 45,4%, 40,1% και 34,37% και 41,6% μετά από 1, 4, 12 και 24 ώρες επώασης αντίστοιχα). Παρατηρείται ότι στις

24 ώρες επώασης δεν μειώνεται περαιτέρω το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, αυτό πιθανώς να οφείλεται σε εκδήλωση ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος.

Ταυτόχρονα, με την πάροδο της επώασης, παρατηρείται μια συνεχής αύξηση στα ποσοστά που αντιστοιχούν στον αποπτωτικό πληθυσμό (από 7,4% στα κύτταρα μάρτυρες το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων αυξήθηκε σε 30,6%, 39,3%, 39% και 41,5% και μετά από 1, 4, 12 και 24 ώρες επώασης αντίστοιχα) και στο νεκρωτικό κυτταρικό πληθυσμό από (0,25% στα κύτταρα μάρτυρες το ποσοστό των νεκρωτικών κυττάρων αυξήθηκε σε 3,43%, 6,45%, 7,13% και 7,13%). Και στις μεταβολές αυτών των 2 τύπων κυττάρων παρατηρείται ότι στις 24 ώρες επώασης δεν αυξάνεται περαιτέρω το ποσοστό τους, αυτό πιθανώς να οφείλεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε εκδήλωση ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος.

Όσον αφορά τα προ-αποπτωτικά κύτταρα δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα το ποσοστό τους σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (10,27%) μετά από 1 (9,02%) και 4 (10,08%) ώρες απόπτωσης. Ενώ, αυξάνεται ο αριθμός των προ-αποπτωτικών κυττάρων μετά από 12 (25,97%) και 24 (20,08%) ώρες επώασης. Αυτές οι μεταβολές πιθανώς να οφείλονται ότι μέχρι και τις 4 ώρες επώασης η μετατροπή των προ-αποπτωτικών κυττάρων σε αποπτωτικά γίνεται με γρήγορο ρυθμό. Ωστόσο, στις 12 και 24 ώρες επώασης παρατηρείται μία στασιμότητα στη μετατροπή των προ-αποπτωτικών κυττάρων σε αποπτωτικά όπως άλλωστε φαίνεται και από το ότι δεν αυξάνεται το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων.

Γενικότερα, φαίνεται πως μετά τις 24 ώρες επώασης εκδηλώνεται κάποια ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων HepG2 έναντι της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος. Όπως φαίνεται από τη βιβλιογραφία, η εκδήλωση της ανθεκτικότητας αυτής των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση πιθανόν να οφείλεται σε ποικίλους χημικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν αύξηση κυτταρικών παραγόντων προ-επιβίωσης, συμπεριλαμβανομένων ογκογόνων παραγόντων και αντι-αποπτωτικών οδών σηματοδότησης (Hervouet E. et al, 2013, Dairkee S.H. et al, 2013, Adams J.M., 2003, Shortt J. et al, 2012, Narayanan KB et al, 2015), ή/και μείωση προ-αποπτωτικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων παραγόντων καταστολής όγκου (Delbridge A.R. et al, 2012, Labbe D.P. et al, 2012, Nicholson K.M. et al, 2002, Zucchini-Pascal N. et al, 2009, Shortt J. et al, 2012, Narayanan KB et al, 2015). Οι

παράγοντες αυτοί είναι πιθανόν εκτός από την ανάπτυξη αντίστασης να ευθύνονται και για την ανάπτυξη περιβαλλοντικής καρκινογένεσης (Narayanan KB et al, 2015). Ταυτόχρονα, έχει δειχθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την αντίσταση τους σε αντικαρκινικές θεραπείες μέσω της αύξησης γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής τους μεμβράνης κωδικοποιώντας για αντλίες ξένων μορίων, οι οποίες σχετίζονται με την αύξηση της ικανότητας εκροής των φαρμάκων εκτός των κυττάρων (Ding Z. et al, 2010, Kruh GD et al, 2003, Krishnomurthy P. et al 2005, Karakashev SV et al, 2015).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρόκληση απόπτωσης είναι σημαντικός μηχανισμός για την αναστολή της αύξησης των κυττάρων HepG2 από το εκχύλισμα *Sanguisorba officinalis*. Κατά την απόπτωση, αρχικά αποπτωτικά σήματα πρέπει να ωθήσουν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες να ξεκινήσουν τη διαδικασία. Το στάδιο αυτό επιτρέπει τα αποπτωτικά σήματα να προκαλέσουν το κυτταρικό θάνατο ή η διαδικασία να σταματήσει, αν το κύτταρο δε χρειάζεται να πεθάνει (Khan, 2010). Πολλές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην απόπτωση, αλλά έχουν αναγνωριστεί δύο κύριες μέθοδοι ρύθμισης. Έτσι η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δυο σηματοδοτικών μονοπατιών. Το άμεσο εξωτερικό μονοπάτι (μέσω υποδοχέων «θανάτου») το οποίο διεγείρεται μέσω της σύνδεσης ενός εξωκυτταρικού συνδέτη σε έναν κατάλληλο υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου και το εκ των έσω (μιτοχονδριακό) μονοπάτι (Mehta et al, 2010). Το δεύτερο μονοπάτι, το οποίο αποτελεί το κύριο μονοπάτι της απόπτωσης στα ανθρώπινα κύτταρα, ενεργοποιείται από εσωτερικά σήματα στρες, όπως η πρόκληση βλαβών στο DNA του κυττάρου, οι αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), η μόλυνση από ιούς ή η ενεργοποίηση ογκογονιδίων.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2, τέτοια ώστε να μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, με ισχυρότερο εκείνο του φυτού *Sanguisorba officinalis* και ασθενέστερο εκείνα του φυτού *Prunus prostrata*. Το εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis* επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων HepG2 με την πάροδο του χρόνου έως και τις 12 ώρες επώασης με αυτό, ενώ στις 24 ώρες παρατηρείται μία πιθανή προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες του εκχυλίσματος και μικρή αποφυγή της αποπτωτικής διαδικασίας.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, η οποία έδειξε αναστολή της κυτταρικής αύξησης ηπατικών καρκινικών κυττάρων HepG2 από τα 9 προαναφερθέντα φυτικά εκχυλίσματα των φυτών του γένους *Prunus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rosa* και *Sanguisorba*, της οικογένειας *Rosaceae*. Γενικότερα, μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με την ανασταλτική δράση αυτών των εκχυλισμάτων από τα εξεταζόμενα φυτικά είδη της οικογένειας *Rosaceae* στην αύξηση καρκινικών κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα άλλες μελέτες ασχολήθηκαν με:

- Ανασταλτική δράση φυτικού εκχυλίσματος από τη *Rosa canina* στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος A-172, U-251 MG και U-1242 MG. Στη μελέτη φάνηκε ότι φυτικά εκχυλίσματα της *Rosa canina* μπορούν να μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, χωρίς την πρόκληση της απόπτωσης και επιδεικνύουν μεγαλύτερη ανασταλτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από ότι η τεμοζολομίδη. (Cagle et al, 2012).
- Ζεστό εκχύλισμα του *Sanguisorba officinalis*. Εξετάστηκε σε HSC4 και HN22 καρκινικά κύτταρα στόματος. Το εκχύλισμα αυτό βρέθηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και να επάγει την απόπτωση και στις δύο εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές (Shin et al, 2012).

Για την πρόοδο της έρευνας στο συγκεκριμένο πεδίο απαιτείται η εξέταση των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε σειρές φυσιολογικών κυττάρων. Επιπροσθέτως, εφόσον τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αφορούν εκχυλίσματα και όχι τα απομονωμένα συστατικά των φυτών, σημαντικός θεωρείται και ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που ευθύνονται για την αντικαρκινική ιδιότητα των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων. Τέλος, ιδιαίτερα χρήσιμες θα ήταν περαιτέρω έρευνες σε μοριακό επίπεδο για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού αναστολής της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων και της επαγωγής της απόπτωσης από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

➤ Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Βαρδαβάκη Μ., Καββαδά Δ., «Κλείδες προσδιορισμού των οικογενειών των αγγειοσπέρμων», Εκδόσεις Δ. Κ. Σαλονικίδης, 1994
- Κιτράκη Ε. και Τρούγκος Κ., 2006, 'Βιολογία του καρκίνου', Ιατρικές εκδόσεις 'Π.Χ. Πασχαλίδης', 2^η έκδοση
- Κουρέτας Δ. Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα, 2003.
- Κωνσταντίνου Α. Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου. Περγαμηνή-Ετήσια έκδοση του Πανεπιστημίου Κύπρου 2008.
- Νακοπούλου Λ, Μιχαλοπούλου Α. Απόπτωση, καρκίνος και θεραπεία. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 11:6-14, 1997
- Σκορίλας Ανδρέας. Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής. Αθήνα 2008.
- Χίου Α.Π., Φυσικοχημεία τροφίμων – Σημειώσεις Φροντιστηρίου, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διατροφολογίας - Διατροφής, 2006

➤ Ξένη Βιβλιογραφία:

- ACS. Cancer Facts and Figures, 1995. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1-3
- Adams J.M. (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.*, 17, 2481–2495.
- Adlercreutz H, Mazur W., Phyto-oestrogens and Western diseases, *Ann Med.* 1997 29:95–120.
- Alter, MJ (2007-05-07). "Epidemiology of hepatitis C virus infection.". *World journal of gastroenterology : WJG* **13** (17): 2436–41.
- Ames BN, Gold LS, Willett WC: The causes and prevention of cancer, 1995, *Proc Nat Acad Sci USA*, 92: 5258-5265
- Bayrak, A., & Akgul, A. (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species. Phytochemistry*, 26, 846–847.
- Bertelli A, Bertelli A.A, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.*, 1998 24:133–138.
- Bidlack WR, Omay S.T, Meskin M.S, Topham DKW, 2000, *Phytochemicals as bioactive agents*. CRC Press
- Bode AM, Dong Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.*, 45:422–430, 2006.
- Bosch FX, Ribes J, Borràs J., Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):271-85.
- Bravo L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 1998; 56(11): 317-333.
- Cagle Patrice, Idassi Ombeni, Carpenter Janelle, Minor Radiah, Goktepe Ipek, Martin Patrick, Effect of Rosehip (*Rosa cnina*) Extracts on Human

- Brain Tumor Cell Proliferation and Apoptosis, *Journal of Cancer Therapy*, 2012, 3, 534-545
- Cairns J : Mutation selection and the natural history of cancer, 1975, *Nature*, 255: 197-200
 - Cammà C, Giunta M, Andreone P, Craxì A. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis: an evidence-based approach. *J Hepatol*. 2001 Apr;34(4):593-602.
 - Chen XH, Zhang BH, Yin X, Qiu SJ, Fan J, Ren ZG, Xia JL, Wang YH, Ye SL, Gan YH. [Effect of postoperative adjuvant transarterial chemoembolization upon early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010 Mar 30;90(12):826-9. Chinese.
 - Cheng, W; S. Govindarajan, A Redeker (feb 1992). "Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease". *Liver International* **12** (1): 42–45
 - Cheynier V., Polyphenols in foods are more complex than often thought, *Am.J. Clin. Nutr.* 2005; 81(1): 223S-229S.
 - Chien-Jen Chen; Hwai-I. Yang; Jun Su; Chin-Lan Jen; San-Lin You; Sheng-Nan Lu; Guan-Tarn Huang; Uchenna H. Iloeje, (2006). "Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level". *JAMA* **295** (1): pp. 65–73.
 - Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y., Tannins and human health: dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998; 79(3): 362-372.
 - Crozier A., Burns J., Azis A.A., Stewart A.J., Rabiasz H.S., Jenkins G.I., Edwards C.A., Lean M., Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability, *Biological Research*. 2000; 33(2).
 - Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.B. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Reports*, 26: 1001-1043, 2009.
 - Dairkee S.H. et al. (2008) Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res.*, 68,2076–2080.
 - De Flora S, Ferguson L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mut Res*, 591: 8-15, 2005.
 - De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM, Noonan D, Albini A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res*. 2001 480-481:9-22..
 - De Flora S, Ramel C: Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis (1990) *Basic Life Sci*, 52: 461-462
 - Delbridge A.R. et al.(2012) The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4.
 - Dew TP, Day AJ, Morgan MR., 2005. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. *J Agric Food Chem* Aug 10;53(16):6510-5.
 - Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 1999, 65(4):337-53.
 - Dig Liver Dis. 2010 Jul;42 Suppl 3:S206-14.
 - Ding Z, Yang L, Xie X, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon

- carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(11):1697–1707.
- Dive C., Gregory C.D., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E. and Wyllie A.H., 1992, ‘‘Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry’’, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1133: 275-285
 - Ebara M, Ohto M, Sugiura N, Kita K, Yoshikawa M, Okuda K, Kondo F, Kondo Y., Eguchi H, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Ito Y, Kishimoto SI, Dono K, Nakamori S, Takeda T, Gotoh M, Wakasa K, Matsuura N, Monden M. Presence of active hepatitis associated with liver cirrhosis is a risk factor for mortality caused by posthepatectomy liver failure. *Dig Dis Sci*. 2000 Jul;45(7):1383-8.
 - El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S27-34.
 - Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(21):10238–10241.
 - Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? *Ann Surg*. 2002 Nov;236(5):602-11.
 - Fialkow PJ : Clonal origin of human tumors, 1979, *Annu Rev Med*, 30: 135-143
 - Fika V: Endometriosis of the cervix uteri incidence and histogenesis, 1986, *Annual of Medical School, Aristotelium University of Thessaloniki*, 16: 183-184
 - Gad-Shayne C, 2009, Alternatives to in vivo studies in toxicology, in *General and Applied Toxicology*, Vol. 6. John Wiley & Sons Inc.
 - Galati, E.M., Monforte, M.T., Tripodo, M.M., Trovato, A., 2000. Antiinflammatory activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. *cladodes* X Congresso della Societa Italiana di Farmacognosia, Assisi, 19 settembre.
 - Gerritsen M.E., Carley W.W., Ranges G.E., Shen C.P., Phan S.A., Ligon G.F., Perry C.A., Flavonoids inhibit cytokine induced endothelial cell adhesion protein gene expression, *Am. J. Pathol*. 1995; 147: 278-292.
 - Halliwell B., Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept, *Nutr. Rev*. 1999; 57: 104-113.
 - Han X., Shen T., Lou H., Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci*. 2007; 8: 950-988.
 - Harborne J.B., Plant Phenolics, In Bell E.A. & Charlwood B.V. (Eds.), *Encyclopedia of plant physiology*, Volyme 8, Secondary Plant Products, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. 1980, pp: 329-395.
 - Harborne J.B., *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman & Hall, London, 1993
 - Harborne J.B. *Nature, distribution and function of plant flavonoids.* Prog Clin Biol Res. 1986, 213:15-24.
 - Hartman PE, Shankel DM. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules, 1990, *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182.
 - Harvorne JB: *Methods in plant biochemistry*, I: Plant phenolics, London: Academic Press, 1989
 - Hashem B. El-Serag, M.D., M.P._H., Hepatocellular Carcinoma, *N.Emg/ J Med* 2011; 365:1118-1127 (2011).

- Hennings H, Shores R, Wenk ML, Spangler EF, Tarone R and Yuspa SH : Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumor initiators and unaffected by tumor promoters, 1983, *Nature*, 304: 67-69
- Hervouet E. et al. (2013) DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells*, 2, 545–573.
- Hikisz P. et al. (2012) PUMA, a critical mediator of cell death—one decade on from its discovery. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 17, 646–669.
- Hill DL, Grubbs CJ. Retinoids and cancer prevention. *Annu Rev Nutr.* 1992 12:161-181.
- Horgan AM, Dawson LA, Swaminath A, Knox JJ. Sorafenib and Radiation Therapy for the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2010 Aug 4.
- Huang MT, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* 1991 51:813-819.
- Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model. *Cancer.* 1991 Nov 15;68(10):2150-4.
- Jaffe LF. (2003). "Epigenetic theories of cancer initiation." *Advances in cancer research.* *Advances in Cancer Research* 90: 209–30.
- Jordan VC. The strategic use of antiestrogens to control the development and growth of breast cancer. *Cancer.* 1992 70:977s-982s
- Kalka K., Ahmad N., Criswell T., Boothman D., Mukhtar H., 2000, "Up-regulation of clusterin during phthalocyanine-4 photodynamic therapy mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors.", *Cancer Research* 60(21) 5984–5987
- Kanno Y : Modulation of cell communication and carcinogenesis, 1985, *Jpn J Physiol*, 35: 693-707
- Karakashev SV, Reginato MJ, Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy, August 2015 Volume 2015:7 Pages 253-264
- Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Takayanagi M, Yoshioka K, Kakumu S, Iijima A, Urushihara A, Kiyosawa K, Okuda M, Hino K, Okita K. Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Osaka Liver Disease Study Group. Hepatology.* 1998 May;27(5):1394-402.
- Kelloff G.J., Hawk E.T., Sigman C.C. *Cancer chemoprevention. Strategies for cancer chemoprevention.* Vol e. Humana Press, 2005.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC: Mechanistic considerations in chemopreventive drug development (1994) *J Cell Biochem (Suppl)* 20: 1024
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Ray JR, sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: *Chemical induction of cancer modulation and combination of effects.* Arcos J, Argus M, Woo Y eds. Birkhauser: Boston, USA, 1997.
- Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther.* 1998 78:167-209.
- Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA and Elliott BE : Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: Induction of high frequency heritable but

- phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment, 1984, *J Cell Physiol*, 3: 87-97
- Khan N., Adhami V.M. and Mukhtar H., 2010, "Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer.", *Endocrine- Related Cancer* 17(1): R39–R52
 - Kim E., Na H., Choi M., Park J., Kim D., Surh Y., 2012, "Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1", *Biochemical Pharmacology* 84:1241–1250
 - Kim J.Y. et al., (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Exp. Med.*, 199, 113–124.
 - Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC and Cavenee WK : Loss of heterozygosity in the embryonal tumours suggests a common pathogenic mechanism, 1985, *Nature*, 316: 330-334
 - Kris Etherton P.M, Hecker K.D, Bonanome A, Coval S.M, Binkoski A.E, Hilpert K.F, Griel A.E, Etherton T.D, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113:S71-88.
 - Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003;63(5):1138–1143.
 - Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals.* 2005;18(4):349–358.
 - Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 2003;22(47):7537–7552.
 - Labbé D.P. et al. (2012) Protein tyrosine phosphatases in cancer: friends and foes! *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 106, 253–306.
 - Lambert J.D., Hong J., Yanf G., Liao J., Yang C.S., Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigation, *American Journal of Clinical Nutrition.* 2005; 81(1): 284S-291S.
 - Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC, Chou FP, Jean LF, Tseng TH. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 203(2):124–131, 2005.
 - Loewenstein WR : Junctional intercellular communication and the control of growth, 1979, *Biochim Biophys Acta*, 560: 1-65
 - López-Lázaro M. (2010). "A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy". *Molecular medicine* 16 (3–4): 144–153.
 - Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ. Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28106–28114.
 - Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr*, 2004; 79: 7270747.
 - Maria Luisa Sotti; Maria Teresa della Beffa, *Le piante aromatiche. Tutte le specie più diffuse in Italia*, Milano, Editoriale Giorgio Mondadori, 1989.
 - Marx J: Many gene changes found in cancer, 1989, *Science*, 246: 1386-1388

- Mehta RG., Murillo G., Naithani R., Peng X., 2010, "Cancer Chemoprevention by Natural Products: How Far Have We Come?", *Pharmaceutical Research* 27:950–961
- Mirvish SS. Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation in chemical, food and biological systems. In: *Inhibition of tumor induction and development*. Zedeck MS, Lipkin M eds. Plenum: New York, USA, 1981.
- Moriwaki H. Prevention of liver cancer: basic and clinical aspects *Exp Mol Med*. 2002 Nov 30;34(5):319-25.
- Morse MA, Stoner GC: *Cancer chemoprevention: principles and prospects*. (1993) *Carcinogenesis*, 14:1737-1746
- Muldoon M.F. & Kritchevsky S.B., *Flavonoids and heart disease*, *Brit. Med. J.* 1996; 312: 458-459.
- Nagasue N, Yamanoi A, el-Assal ON, Ohmori H, Tachibana M, Kimoto T, Kohno H. Major compared with limited hepatic resection for hepatocellular carcinoma without underlying cirrhosis: a retrospective analysis. *Eur J Surg*. 1999 Jul;165(7):638-46.
- Narayanan KB, Ali M, Barclay BJ, Cheng QS, D'Adronzo L, Dornetshuber-Fleiss R, Ghosh PM, Gonzalez Guzman MJ, Lee Y, Leung PS, Li L, Luuanpitpong S, Ratovitski E, Rojanasakul Y, Romano MF, Romano S, Sinha Rk, Yedioou C, Al-Mulla F, Al-RA, Mondello C, Raju J, Salem HK, Wookdrick J, Kim SY, Bisson WH, Lowe L, Park HH, *Disruptive environmental chemicals and cellular mechanisms that confer resistance to cell death*, *Carcinogenesis*, Jun;36 Supl 1: S89-110. doi: 10.2093/carcin/bgv032.
- Nicholson K.M. et al. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.*, 14, 381–395.
- Nicolson GL : Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype from oncogene to oncofetal expression, 1987, *Cancer Res*, 47: 1473-1487
- Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma.
- Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2006 Aug 28;240(2):157-69. Epub 2005 Oct 17. Review.
- Parkar S.G., Stevenson D.E., Skinner M.A., The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health, *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 124(3): 295-298.
- Parkin D.M., Bray F.I., Devesa S.S., Cancer burden in the year 2000. The global picture., *European Journal of Cancer* September 2001.
- Percutaneous ethanol injection for the treatment of small hepatocellular carcinoma. Study of 95 patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 1990 Nov-Dec;5(6):616-26.
- Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J.
- Potter D., T. Eriksson, Evans S-H. Oh, J.E.E. Smedmark, D.R Morgan, M.S.Kerr and C.S.Campbell, *Phylogeny and classification of Rosaceae*, *Plant Systematics and Evolution*, 2007, Volume 266, 5-43
- Potter VR : Use of two sequential applications of initiators in the production of hepatomas in the rat: an examination of the Solt-Farber protocol, 1984, *Cancer Res*, 44: 2733-2736

- Ramos S., 2007, 'Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention', Journal of Nutritional Biochemistry 18: 427–442
- Rasnick D, Duesberg PH. (1999). "How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer" The Biochemical journal 340 (3): 621–30. DOI:10.1042/0264-6021:3400621. PMC1220292 PMID 10359645
- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. Cancer Res. 1987 47:5340-5346.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Antioxidant properties of phenolic compounds, Plant Science. 1997; 2(4): 152-159
- Robebert L. Nussbaum Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard. "Thompson & Thompson Ιατρική Γενετική". Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης. 7^η Έκδοση. Αθήνα.2011
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M., Polyphenols: antioxidants and beyond, American Journal of Clinical Nutrition. 2005a; 81(1): 217S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., *et al.*, Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005, 45, 287-306.
- Shahidi F, Naczki M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc: Lancaster, PA, 1995.
- Shapiro H.M., 2003, 'Practical Flow Cytometry, 4th ed. Wiley-Liss, New Jersey
- Shin Ji-AE, Kim Jun-Sung, Kwon Ki-Han, Nam Jeong-Seo, Jung Ji-Youn, Cho Nam-Pyo, Cho Sung-Dae, Apoptotic effect of hot water extract of *Sanguisorba officinalis* L. in human oral cancer cells, *Oncol Lett.* 2012 Sep; 4(3): 489-494
- Shukla Y., Kumar Pal.S. Dietary cancer chemoprevention: An overview. *Inter J Jum Gen*, 4: 265-276, 2004.
- Slamenova D., Masterova I., Labaj J., Horvathova E., Kubala P., Jakubikova J., Wsolova L., Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cell cultured in vitro, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 94: 282-290, 2004
- Smith JJ, Tully P, Padberg RM. Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy. *Sem Oncol Nurs*, 21: 243-251, 2005.
- Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc.* 35 (1976) 1332-1338.
- Sporn MB, Liby KT. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Oct;2(10):518-25.
- Stocker, P., M. Yousfi, O. Djerridane, J. Perrier, R. Amziani, S. El-Boustani and A. Moulin, 2004. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie*, 86: 919-925.
- Sun S.Y., Hail N., Lotan R., 2004, 'Apoptosis as a novel target of cancer chemoprevention.', *J Nat Cancer Inst* 69: 662-669
- Surch Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3:768–80, 2003.

- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathe G., Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine and Pharmacotheraph.* 2002; 56(4): 200-207.
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000 80:1073–1080.
- Trosko JE, Chang CC and Medkalf A : Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication, 1983, *Cancer Invest*, 1: 511-526
- Urquiaga I. & Leighton F., Plant Polyphenol Antioxidants and oxidative stress, *Biol. Res.* 2000; 3(2)
- Van IJzendoorn, M. H., & DeWolff, M.S. (1997). In search of the absent father: Meta-analyses on infant-father attachment. A rejoinder to out discussants. *Child Development*, 63,840-858.
- Van IJzendoorn, M.H., Moran, G., Belsky, J., Pedersin, D., Bakermans-Kranenburg, M.J. & Kneppers, K. (2000). The similarity of siblings' attachments to their mothers. *Child Development*, 71, 1086-1098.
- Vente MA, Wondergem M, van der Tweel I, *et al* (April 2009). "Yttrium-90 microsphere radioembolization for the treatment of liver malignancies: a structured meta-analysis". *Eur Radiol* **19** (4): 951–9.
- Vermeris W, Nicholson R (2006) In *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer.
- Vinson J.A., Flavonoids in Foods as in Vitro and in Vivo Antioxidants, *Adv. Exp. Mes. Biol.* 1998; 439: 151-164.
- Vita J.A., Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function, *Am.j.Clin. Nitr.* 2005;81: 292S-2977S.
- Wang, Xin W; S.Perwez Hussain, Teh-Ia Huo, Chuan-Ging Wu, Marshonna Forgues, Lorne J Hofseth, Christian Brechot and Curtis C Harris (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma". *Toxicology* 181-182: 43–47
- Watson, L., and Dallwitz, M.J. (1992 onwards). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 21st March 2010.
- Wattenberg LW: Chemoprevention of cancer (1985) *Cancer Res*, 45:1-8.
- Wilkinson, ML; B Portmann, R Williams (1983). "Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper". *Gut* 24 (8): 767–771
- Yu J. et al., (2008) PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*,27(suppl 1), S71–S83.
- Zern T.L. & Fernandez M.L., Cardioprotective effects of dietary polyphenols, *J.Nutr.* 2005;135: 2291-2294.
- Zhang L-X, Cooney RV, Bertram JS: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells (1991) *Carcinogenesis*,12:2109-2114.
- Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer* 2:705-713, 2002
- Zucchini-Pascal N. et al. (2009) Lindane and cell death: at the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology*, 256, 32–41.

