

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ -
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ*

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ
ROSACEAE ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΗΠΑΤΟΣ**

Διπλωματική Εργασία

του

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΜΕΛΙΔΗ

Θεσσαλονίκη, 2017

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ
ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ROSACEAE ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΗΠΑΤΟΣ

STUDY OF THE EFFECT OF ROSACEAE FAMILY POLYPHENOLIC
EXTRACTS ON HUMAN LIVER CANCER CELL PROLIFERATION

Δημήτριος Μελίδης

Χημικός, ΑΠΘ

Διπλωματική Εργασία

Υποβαλλόμενη για τη μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων του

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΣΠΟΥΔΩΝ

*ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ*

Τριμελής εξεταστική επιτροπή,

Δημήτριος Στάγκος (Επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Περίληψη

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, ο καρκίνος του ήπατος, είναι ο έκτος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως (6%), ενώ αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο (9%). Το 2012 σημειώθηκε σε 782.000 άτομα και το 2015 είχε ως αποτέλεσμα 810.500 θανάτους.

Από όλους τους τύπους καρκίνου του ήπατος, ο συχνότερος, που αντιπροσωπεύει το 75% όλων των πρωτοπαθών καρκίνων του ήπατος, είναι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC).

Πρακτικές όπως ο χημειοεμβολισμός, η ενέσιμη χρήση αλκοόλης ή οι ραδιοσυχνότητες μπορεί να είναι χρήσιμες ως παρηγορητικές θεραπείες, παρόλα αυτά επί του παρόντος, δεν υπάρχει κανένα φάρμακο ή συνδυασμός φαρμάκων που να έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπεία για τον καρκίνο του ήπατος. Για τον σκοπό αυτό είναι κρίσιμο, να αναπτύξουμε νέες στρατηγικές αναζήτησης πιθανών θεραπειών.

Η χημειοπροφύλαξη, η χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων για την αναστροφή, την καταστολή ή την πρόληψη της καρκινογένεσης, αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο αντιμετώπισης του HCC. Πολυάριθμες έρευνες έχουν δείξει, ότι μεγάλος αριθμός φυτοχημικών ουσιών αναστέλλει μηχανισμούς έναρξης και προαγωγής της καρκινογένεσης.

Αυτή η εργασία, εστιάζεται στις φυτικές πολυφαινόλες, μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυτοχημικών συστατικών, και τις χημειοπροφυλακτικές τους ιδιότητες εναντίον του HCC. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση 11 πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά της οικογένειας Rosaceae, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2. Τα εκχυλίσματα ανήκουν στα φυτά: *Potentilla recta*, *Sorbus umbellata*, *Aremonia agrimonoides*, *Geum urbanum*, *Potentilla pedata*, *Alchemilla xanthochlora*, *Potentilla speciosa*, *Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Prunus prostrata*, *Crataegus orientalis*. Στο πρώτο στάδιο, έγινε η εκτίμηση της δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο του XTT, και τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική, δοσοεξαρτώμενη, δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των κυττάρων HepG2, με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 60 (*Crataegus orientalis*) έως και 315 μg/mL (*Prunus prostrata*), επιβεβαιώνοντας τον χαρακτηρισμό τους σαν πιθανούς χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες. Τέλος, στη δεύτερη φάση της μελέτης, και με

δεδομένη την ανάλυση των πολυφαινολών των εκχυλισμάτων από το εργαστήριο του κυρίου Χαρουτουνιάν, έγινε στατιστική ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (τιμές r) των τιμών IC_{50} με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα Rosaceae.

Abstract

According to the World Health Organization, liver cancer is the sixth most common type of cancer in the world (6%), and is the second leading cause of cancer death (9%). In 2012 there were 782,000 people and in 2015 there were 810,500 deaths.

Of all types of liver cancer, the most common, accounting for 75% of all primary liver cancers, is hepatocellular carcinoma (HCC).

Practices such as chemotherapy, injecting alcohol or radio frequency may be useful as palliative care, but there is currently no drug or combination of drugs that has been shown to be an effective treatment for liver cancer. To this end, it is crucial to develop new search strategies for possible treatments.

Chemoprevention, the use of natural or synthetic chemical agents to reverse, suppress or prevent carcinogenicity, is an important way to treat HCC. Numerous studies have shown that a large number of phytochemicals inhibit mechanisms of initiation and promotion of carcinogenicity.

This work focuses on plant polyphenols, one of the most important categories of phytochemicals, and their chemoprophylactic properties against HCC. Specifically, the effect of 11 polyphenolic extracts from plants of the Rosaceae family on the growth of HepG2 liver cancer cells was examined. The extracts belong to the plants: *Potentilla recta*, *Sorbus umbellata*, *Aremonia agrimonoides*, *Geum urbanum*, *Potentilla pedata*, *Alchemilla xanthochlora*, *Potentilla speciosa*, *Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Prunus prostrata*, *Crataegus orientalis*. In the first step, the effect of extracts was evaluated by the XTT method, and the results showed an inhibitory, dose-dependent effect of all extracts on the cell growth of HepG2 cells, with IC₅₀ values ranging from 60 (*Crataegus orientalis*) to 315 µg/mL (*Prunus prostrata*), confirming their characterization as potential chemopreventive agents. In the second phase of the study, and given the analysis of the polyphenols of the extracts from Mr. Harutunian's laboratory, a Spearman correlation analysis of the IC₅₀ values with the concentrations of polyphenols in the Rosaceae extracts was performed.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή	11
1.1 Καρκίνος	11
1.1.1 Γενικά	11
1.1.2 Χαρακτηριστικά του καρκίνου.	15
1.1.3 Η πολυσταδιακή ανάπτυξη του καρκίνου.	16
1.1.4 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων	18
1.1.5 Τα είδη των όγκων	21
1.1.6 Τα αίτια του καρκίνου (ο ρόλος των γονιδίων).	22
1.1.7 Παράγοντες καρκινογένεσης	27
1.1.8 Ο καρκίνος του ήπατος	31
1.2 Ελεύθερες ρίζες, δραστικές οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) και μηχανισμοί καρκινογένεσης.	35
1.3 Φυτοχημικές ουσίες με αντικαρκινική δράση.	39
1.3.1 Οι κυριότερες φυτοχημικές ουσίες των τροφίμων με αντιοξειδωτική και Αντικαρκινική δράση.	42
1.3.2 Φυτοχημικές ουσίες και Αντικαρκινική δράση.	46
1.3.3 Μεταβολισμός των πολυφαινολικών μικροσυστατικών της διατροφής.	49
1.3.4 Μηχανισμοί αναστολής της καρκινογένεσης από φυτοχημικές ουσίες.	51
1.4 Οικογένεια Rosaceae	63
1.4.1 <i>Potentilla recta</i> (Ποτεντίλλα η Όρθια).	65
1.4.2 <i>Sorbus umbellata</i> (Σορβιά η σκιαδιώδης)	66
1.4.3 <i>Aremonia agrimonoides</i> (Αρεμονία η αγριμονιοειδής)	66
1.4.4 <i>Geum urbanum</i> (Γέο ή Γκέο το αστικό)	67
1.4.5 <i>Potentilla pedata</i>	68
1.4.6 <i>Alchemilla xanthochlora</i> (Αλχεμίλλη)	68
1.4.7 <i>Potentilla speciosa</i>	69
1.4.8 <i>Fragaria vesca</i> (Χαμαικέρασος η λεπτή)	69
1.4.9 <i>Rubus idaeus</i> (βάτος η ιδιαί)	70
1.4.10 <i>Prunus prostrata</i> (Αγριοκερασιά – mountain cherry)	71
1.4.11 <i>Crataegus orientalis</i> (Κράταιγος ο ανατολικός)	72

1.5 Σκοπός του πειράματος.	73
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	74
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	74
2.1.1 Κυτταρική σειρά	74
2.1.2 Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος	75
2.1.3 Εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας Rosaceae	77
2.1.4 Συσταση Πολυφαινολών των Εκχυλισμάτων	77
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	79
2.2.1 Μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα HepG2 με την μέθοδο του XTT.	80
3 Αποτελέσματα	86
3.1 <i>Επίδραση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα HepG2 με την μέθοδο του XTT</i>	86
3.1.1 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Potentilla recta</i>	87
3.1.2 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Sorbus umbellate</i>	88
3.1.3 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Aremonia agrimonoides</i>	89
3.1.4 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Geum urbanum</i>	90
3.1.5 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Potentilla pedata</i>	91
3.1.6 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Alchemilla xanthochlora</i>	92
3.1.7 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Potentilla speciosa</i>	93
3.1.8 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Fragaria vesca</i>	94
3.1.9 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Rubus idaeus</i>	95
3.1.10 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Prunus prostrata</i>	96
3.1.11 Επίδραση του εκχυλίσματος <i>Crataegus orientalis</i>	97
3.1.12 Αξιολόγηση αποτελέσματος	98
3.1.13 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης των τιμών IC ₅₀ με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα Rosaceae.	99
3.2 Συζήτηση	101
4 Βιβλιογραφία	104

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ο πάπυρος του Edwin Smith.....	11
Εικόνα 2: Εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων μέσω τις φυσικής επιλογής.....	17
Εικόνα 3: Μέσος αριθμός νέων περιπτώσεων τον χρόνο και συσχετισμός τους με την ηλικία	18
Εικόνα 4: Παγκόσμια κατανομή του καρκίνου του ήπατος για το 2012.....	31
Εικόνα 5: Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά, και πώς εμπλέκονται στην γήρανση	38
Εικόνα 6: Μελέτη της δράσης των βιοδραστικών συστατικών των τροφών μέσω των 'omics'	40
Εικόνα 7: Κατηγοριοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων.....	42
Εικόνα 8: Μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται ο παράγοντας NF-kB.	57
Εικόνα 9: Δράση των φυτοχημικών συστατικών στο μονοπάτι Wnt/ β -catenin.	61
Εικόνα 10: <i>Potentilla Recta</i>	65
Εικόνα 11: <i>Sorbus Umbellate</i>	66
Εικόνα 12: <i>Aremonia Agrimonoides</i>	66
Εικόνα 13: <i>Geum Urbanum</i>	67
Εικόνα 14 <i>Potentilla Pedata</i>	68
Εικόνα 15: <i>Alchemilla Xanthochlora</i>	68
Εικόνα 16: <i>Potentilla Speciosa</i>	69
Εικόνα 17: <i>Fragaria Vesca</i>	69
Εικόνα 18: <i>Rubus Idaeus</i>	70
Εικόνα 19: <i>Prunus Prostrate</i>	71
Εικόνα 20: <i>Crataegus orientalis</i>	72
Εικόνα 21: Κύτταρα HepG2	74
Εικόνα 22: Αναγωγή του XTT στην χρωμοφόρο Φορμαζάνη.....	81
Εικόνα 23: Αναγωγή του XTT στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.	81
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού κυτταρικής αναγωγής των τετραζολιακών αλάτων MTT	82
Εικόνα 25: Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer	83
Εικόνα 26: 96-wel ELISA microplate	84

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 1: % αναστολή της κυτταρικής αύξησης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του <i>Potentilla recta</i>	87
Γράφημα 2: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Sorbus umbellata</i>	88
Γράφημα 3: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Aremonia agrimonoides</i>	89
Γράφημα 4: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Geum urbanum</i>	90
Γράφημα 5: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Potentilla pedata</i>	91
Γράφημα 6: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Alchemilla xanthochlora</i>	92
Γράφημα 7: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Potentilla speciosa</i>	93
Γράφημα 8: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Fragaria vesca</i>	94
Γράφημα 9: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Rubus idaeus</i>	95
Γράφημα 10: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Prunus prostrata</i>	96
Γράφημα 11: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού <i>Crataegus orientalis</i>	97
Γράφημα 12: Συγκεντρωτικός πίνακας των IC50 των μελετηθέντων εκχυλισμάτων.....	98

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Rosaceae που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.....	77
Πίνακας 2: Πολυφαινολική συσταση των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν	78
Πίνακας 3: Στατιστική ανάλυση συσχέτισης των τιμών IC50 με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα Rosaceae.....	99

1 Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

1.1.1 Γενικά



Εικόνα 1: Ο πάπυρος του Edwin Smith. Η πρώτη ιστορική αναφορά σε καρκινικό όγκο. [1]

Ως καρκίνος, ορίζεται κάθε κακοήθης όγκος που μπορεί να εμφανιστεί σε οποιονδήποτε από τους ιστούς του οργανισμού (π.χ. του πνεύμονα/ των μαστών/ του στομάχου) και έχει την τάση να επανεμφανίζεται μετά από κάθε αφαίρεσή του ή να σχηματίζει μεταστάσεις σε γειτονικά ή και απομακρυσμένα σημεία του σώματος. Η σημερινή σημασία του όρου είναι ήδη αρχαία. Η λέξη καρκίνος, προέρχεται από την ελληνική λέξη για τον κάβουρα και αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη (460–377 π.Κ.Χ.). Ο όγκος, με τις αρπάγες πρησμένων αγγείων αίματος γύρω του, θυμίζει στον Ιπποκράτη έναν κάβουρα ο οποίος σκάβει στην άμμο με τα πόδια του απλωμένα σε σχήμα κύκλου [2].

Ο καρκίνος, εμφανίζεται στους ανθρώπους, καθώς και άλλα ζώα, καθ' όλη την διάρκεια της ιστορίας. Δεν αποτελεί λοιπόν έκπληξη, το γεγονός ότι οι άνθρωποι έχουν γράψει για τον καρκίνο από πολύ παλιά. Κάποιες από τις πρώτες ενδείξεις καρκίνου, εντοπίζονται σε όγκους απολιθωμένων οστών ταριχευμένων ανθρώπων στην αρχαία Αίγυπτο, καθώς και σε αρχαία χειρόγραφα. Η παλαιότερη περιγραφή του καρκίνου (αν και δεν χρησιμοποιήθηκε ως λέξη) ανακαλύφθηκε στην Αίγυπτο και είναι

καταγεγραμμένη στον πάπυρο του Edwin Smith. Ο πάπυρος, που φέρει το όνομα του αιγυπτιολόγου ιδιώτη που τον αγόρασε το 1862, θεωρείται ότι γράφτηκε τον 17ο αιώνα π.Κ.Χ., και αποτελεί αντίγραφο ενός χειρόγραφου το οποίο χρονολογείται το 2500 π.Κ.Χ. Ο πάπυρος μεταφράστηκε το 1930 και θεωρείται πλέον ότι περιέχει το σύνολο των διδασκαλιών του Ιμχοτέπ, του μεγάλου αιγύπτιου γιατρού ο οποίος έζησε γύρω στο 2625 π.Κ.Χ. Πρόκειται για ένα εγχειρίδιο σχετικά με τη χειρουργική επέμβαση τραυμάτων, στο οποίο περιγράφονται 48 περιπτώσεις (καταγμάτων, πληγών κ.λπ.), τα οποία αντιμετωπίζονται ως ιατρικά περιστατικά και όχι ως φαινόμενα μαγείας. Στο περιστατικό 45, ο Ιμχοτέπ γράφει [3] [4]:

Περίπτωση 45. Όγκος στο στήθος

Τίτλος:

"Πρακτική για όγκο, που μοιάζει με μπάλα, στον μαστό."

Εξέταση και Πρόγνωση:

"Εάν εξετάσεις ένα περιστατικό στο οποίο εμφανίζεται όγκος, που μοιάζει με μπάλα, στον μαστό και βρεις ότι έχει διασκορπιστεί πάνω στο στήθος και βάλεις το χέρι σου πάνω στο μαστό και τον βρεις κρύο [τον όγκο], και δεν είναι καθόλου θερμός όταν τα χέρια σου τον αγγίζουν, αν δεν έχει κοκκιώδη υφή, δεν περιέχει υγρό ή δεν εκβάλλει υγρό, αλλά όταν τον αγγίζεις τον αισθάνεσαι σαν μπάλα, τότε θα πρέπει να πεις σχετικά με αυτό: Είναι ένα περιστατικό με όγκο, που μοιάζει με μπάλα, η ασθένεια την οποία πρέπει να αντιμετωπίσω."

Θεραπεία:

"Δεν υπάρχει"

Σήμερα, περισσότερο από τέσσερις χιλιετίες αργότερα, δεν έχει βρεθεί ακόμη μια γενική θεραπεία για τον καρκίνο. Ωστόσο, θα είναι αφελής όποιος θεωρήσει ότι καμία πρόοδος δεν έχει γίνει. Μετά την έκρηξη του κλάδου των βιοεπιστημών στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, και ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει τρομερά βήματα για την κατανόηση της φυσιολογίας σε κυτταρικό επίπεδο. Έχουμε πλέον μια εικόνα για τους μηχανισμούς που διέπουν την επικοινωνία και την οργάνωση των κυττάρων και έχει γίνει πλέον κατανοητό το πλαίσιο της δημιουργίας και της ανάπτυξης πολλών ασθενειών, όπως και του καρκίνου.

Είναι γνωστό πλέον πως, ως όντα, έχουμε αναπτύξει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ένα ιδιαίτερα σοφό σύστημα ελέγχου της κυτταρικής συμπεριφοράς. Ένα σύστημα, που καθοδηγεί την ανάπτυξή μας ξεκινώντας από ένα και μόνο κύτταρο, έως τη δημιουργία του πολύπλοκότετου ενήλικου σώματός μας. Είναι αντιληπτό, πως ένας τέτοιος μηχανισμός ελέγχου, αποτελεί αναγκαία συνθήκη ύπαρξης ενός οργανισμού τόσο πολύπλοκου όπως ο άνθρωπος. Αρκεί να σκεφτούμε, πως ολόκληρο το σώμα μας, η συμπεριφορά μας, η σκέψη μας καθώς και τα συναισθήματά μας, ρυθμίζονται από ένα σύνολο 10.000.000.000.000 περίπου κυττάρων που αλληλεπιδρούν, συνεργάζονται, ανταλλάσσουν πληροφορίες, διπλασιάζονται και πεθαίνουν, συνεχώς. Η σημαντικότητα αυτού του μηχανισμού διαφαίνεται επίσης κάθε φορά που αναρρώνουμε από μία ασθένεια και κάθε φορά που παρατηρούμε κάποια πληγή μας να επουλώνεται, τις περισσότερες φορές τόσο τέλεια, που δεν μένει τίποτα που να μας υπενθυμίζει την κάποτε πληγείσα περιοχή. Ωστόσο, υπάρχει ένα σημαντικό τμήμα για την ικανότητά μας αυτή, να επιδιορθώνουμε και να ανανεώνουμε το σώμα μας. Οι προσεκτικά ρυθμιζόμενοι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτές τις διεργασίες, πολλές φορές απορρυθμίζονται (κάτω από συνθήκες που γίνονται ολοένα και περισσότερο γνωστές), οδηγώντας σε καταστροφικές συνέπειες. Το σημαντικότερο νόσημα που προκύπτει από αυτή την απορρύθμιση, είναι ο καρκίνος.

Σήμερα γνωρίζουμε, πως ο καρκίνος δεν είναι μια ασθένεια. Είναι στην πραγματικότητα μια ομάδα πολλών ασθενειών (περίπου 200 είδη είναι γνωστά), που προσβάλλει διάφορα μέρη του σώματος με διάφορους τρόπους, ωστόσο, στο θεμελιώδες βιολογικό επίπεδο, η κύρια διαταραχή παραμένει πάντα η ίδια: Αποδιοργάνωση και ανεξέλεγκτη ανάπτυξη του προσβεβλημένου ιστού. Τα καρκινικά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από έναν παθολογικά ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Πρόκειται για κύτταρα που μερικές φορές δεν ξέρουν πώς να πεθάνουν και που ποτέ δεν ξέρουν πώς να σταματήσουν να διαιρούνται. Η ανώμαλη και ανεξέλεγκτη αυτή ανάπτυξη, είναι μια διαδικασία η οποία συνήθως αρχίζει με ένα και μόνο κύτταρο. Αυτό πολλαπλασιάζεται ξανά και ξανά, και κάθε γενιά διαγράφει έναν μικρό εξελικτικό κύκλο, έτσι ώστε να έχουμε ολοένα και πιο εξελιγμένα ή διαφοροποιημένα κύτταρα. Ωστόσο, αν και υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα μεταξύ του καρκίνου του προστάτη, του καρκίνου του ήπατος, του μαστού κλπ, κάθε καρκίνος έχει το δικό του πρόσωπο.

Καθώς, ιστορικά, ο κίνδυνος των μολυσματικών ασθενειών μειώθηκε, μετά την ανάπτυξη των αντιβιοτικών και των εμβολίων, η συχνότητα εμφάνισης άλλων νόσων

αυξήθηκε. Πολλοί άνθρωποι που έναν αιώνα πριν θα πέθαιναν νέοι από φυματίωση, διφθερίτιδα, πνευμονία ή τύφο, τώρα ζουν αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να εμφανίσουν καρδιακή νόσο ή καρκίνο. Στις μέρες μας, ο καρκίνος αποτελεί πλέον ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται στις αναπτυγμένες χώρες, και οι στατιστικές τον κατατάσσουν στη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. [5]

Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει σημαντικά βήματα στον τομέα της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου. Πολλοί τύποι, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη, είναι σε μεγάλο βαθμό αντιμετωπίσιμοι εάν διαγνωστούν εγκαίρως.

Η αντιμετώπιση του καρκίνου γίνεται συχνά, με συνδυασμό θεραπείας με ακτινοβολία, χειρουργικής αντιμετώπισης, χημειοθεραπείας, και στοχευμένης θεραπείας, παρόλα αυτά η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση παραμένουν τα σημεία κλειδιά. Χαρακτηριστικά, θεωρείται πως το 30-50% όλων των καρκίνων, μπορούν να προληφθούν με την υιοθέτηση ενός υγιούς τρόπου ζωής [6].

Η έρευνα για τον καρκίνο συγκεντρώνει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, και είναι ένα πεδίο που γνωρίζει έντονη κινητικότητα και αναπτύσσεται συνεχώς. Πρόκειται για έναν τομέα με ιδιαίτερο κοινωνικό, πολιτικό και οικονομικό ενδιαφέρον, και αυτό συντελεί στην μεγάλη πρόοδο που γνωρίζει τα τελευταία χρόνια. Η έρευνα για τον καρκίνο είναι πυρετώδης, και με τη συμβολή νέο-αναπτυσσόμενων τεχνολογιών, βρισκόμαστε ολοένα και πιο κοντά στην ανάπτυξη νέων θεραπειών.

1.1.2 Χαρακτηριστικά του καρκίνου.

Ο καρκίνος, χαρακτηρίζεται από παραβάσεις των βασικών κανόνων που διέπουν την συμπεριφορά των κυττάρων. Κάθε κύτταρο, πρέπει να διαιρείται μόνο όταν χρειάζονται νέα κύτταρα αυτού του είδους, και να σταματά να διαιρείται όταν δεν χρειάζονται. Πρέπει να διατηρεί τον κατάλληλο εξειδικευμένο χαρακτήρα του (ως μέρος του εκάστοτε ιστού) και να περιορίζεται στην θέση του, χωρίς να μεταναστεύει σε άλλες περιοχές. Πρέπει να ζει για όσο είναι απαραίτητο και να πεθάνει όταν πρέπει να πεθάνει. Όταν ένα κύτταρο, υποστεί μια γενετική βλάβη σε σημείο που να επηρεάζεται η παρεμποδίζεται τουλάχιστον μία από αυτές τις λειτουργίες, είναι πιθανό να του δοθεί η δυνατότητα να επιβιώνει και να διαιρείτε ενώ δεν θα έπρεπε. Αυτή η δυνητικά καταστροφική απώλεια ελέγχου, θα οδηγήσει σε παραγωγή άναρχων θυγατρικών κυττάρων που θα κληρονομήσουν αυτή την συμπεριφορά, πράγμα που θα έχει ως συνέπεια, αρχικά να χαθεί η οργάνωση του ιστού, στη συνέχεια να διηθηθούν παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί και τελικά να παρεμποδιστεί η λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού οδηγώντας μοιραία στον θάνατο. Αυτή ακριβώς είναι η καταστροφική εξέλιξη που συμβαίνει στον καρκίνο [7].

Τα καρκινικά κύτταρα, χαρακτηρίζονται από δύο ξεχωριστές ιδιότητες τις οποίες μεταβιβάζουν στους απογόνους τους:

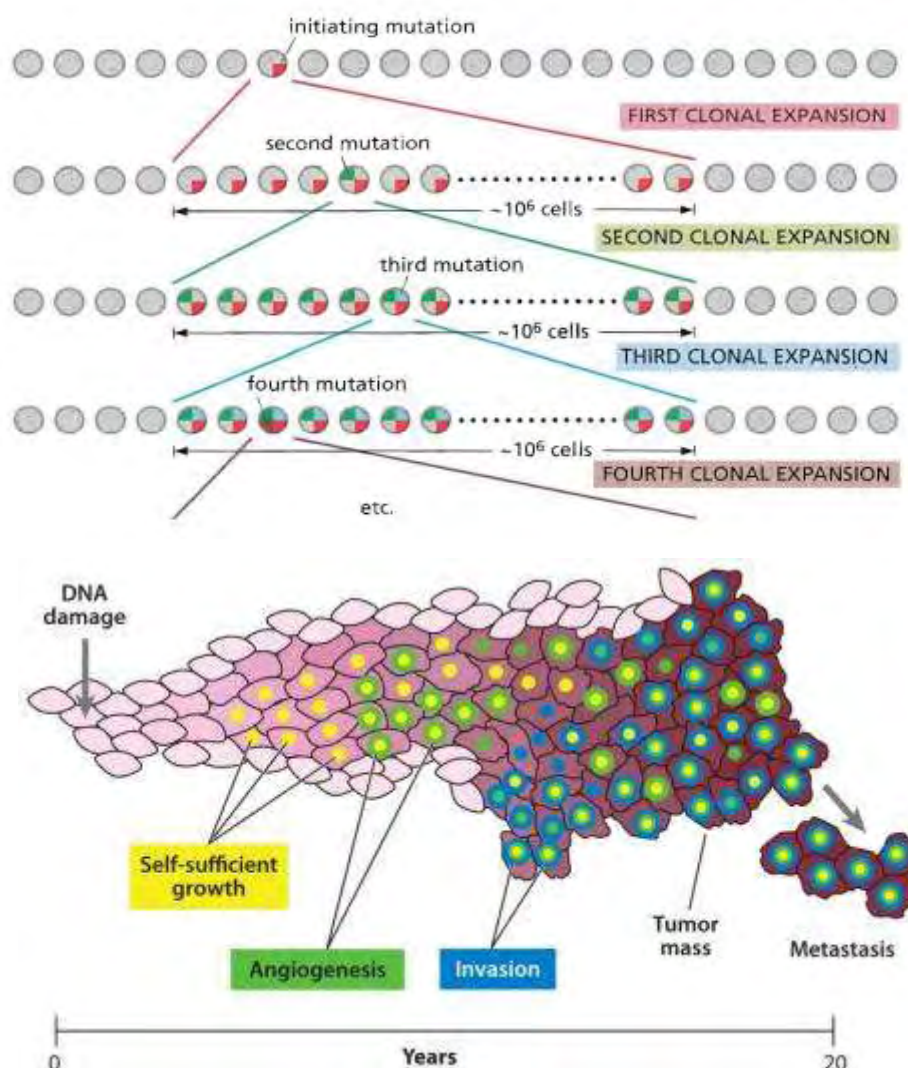
- i. Δεν υπακούουν πλέον στους μηχανισμούς που ελέγχουν την αύξηση και την κυτταρική διαίρεση, οπότε εξακολουθούν να διαιρούνται.
- ii. Διεισδύουν και αποικίζουν τόπους που κανονικά αποτελούν επικράτειες άλλων κυττάρων.

Αυτό που κάνει τον καρκίνο ιδιαίτερα επικίνδυνο, είναι ο συνδυασμός και των δύο παραπάνω ιδιοτήτων. Τα κύτταρα που εμφανίζουν μόνο την πρώτη και όχι την δεύτερη ιδιότητα, μπορούν να πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα σχηματίζοντας έτσι έναν όγκο. Σε αυτήν την περίπτωση, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως καλοήγητος. Είναι εντοπισμένος και συνήθως μπορεί να αφαιρεθεί πλήρως με χειρουργική επέμβαση, ενώ της περισσότερες φορές δεν αποτελεί παρά μόνο αισθητικό πρόβλημα (φακίδες, κρεατοελιές, ή λιπώματα στο δέρμα). Στην περίπτωση όμως που τα κύτταρα εμφανίζουν

και την δεύτερη ιδιότητα, ο όγκος χαρακτηρίζεται καρκινικός (κακοήθης) και μπορεί να διεισδύσει στους παρακείμενους ιστούς. Τα κύτταρα αυτά, μπορούν να εγκαταλείψουν τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή στα λεμφαγγεία και να σχηματίσουν δευτεροπαθείς όγκους (μεταστάσεις), σε άλλες θέσεις του σώματος. Η κατάσταση αυτή είναι ιδιαίτερα κρίσιμη καθώς δυσχεραίνει την δυνατότητα αντιμετώπισης της νόσου. Με τα σημερινά μέσα, ο καρκίνος συνήθως διαγιγνώσκεται αφού προηγουμένως αυξηθεί τόσο ώστε να περιέχει εκατοντάδες εκατομμύρια κύτταρα. Είναι κρίσιμο, η διάγνωση αυτή να γίνει το συντομότερο δυνατό, καθώς, όσο περισσότερες μεταστάσεις έχει ο καρκίνος, τόσο πιο δύσκολη είναι η εντόπιση άρα και η αντιμετώπισή του [7].

1.1.3 Η πολυσταδιακή ανάπτυξη του καρκίνου.

Σε σπάνιες μόνο περιπτώσεις, μία και μόνο μεμονωμένη μετάλλαξη είναι ικανή να προκαλέσει την καρκινογένεση. Συνήθως χρειάζονται πολλαπλές μεταλλάξεις για να αναπτύξει ένα κύτταρο, καρκίνο. Η διαδικασία αυτή αρχίζει με την "εναρκτήρια μετάλλαξη" στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου (αρχικό κλωνικό κύτταρο) οι απόγονοι του οποίου συσσωρεύουν και άλλες μεταλλάξεις και επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA τους. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στον καρκίνο, προσδίδουν στα κύτταρα ένα σημαντικό συναγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των γειτονικών τους κυττάρων και μια αυξημένη ικανότητα για προσαρμογή και επιβίωση. Ακόμη και σε ένα περιβάλλον χωρίς μεταλλαξιογόνους παράγοντες, οι μεταλλάξεις συμβαίνουν με συχνότητα περίπου 10^{-6} μεταλλάξεις ανά γονίδιο ανά κυτταρική διαίρεση. Η τιμή αυτή καθορίζεται από τους εγγενείς περιορισμούς της ακρίβειας της αντιγραφής του DNA [8]. Η φυσική επιλογή, ευνοεί κύτταρα με μεταλλάξεις που αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, ανεξάρτητα από τις συνέπειες που αυτό θα έχει στα γειτονικά κύτταρα.

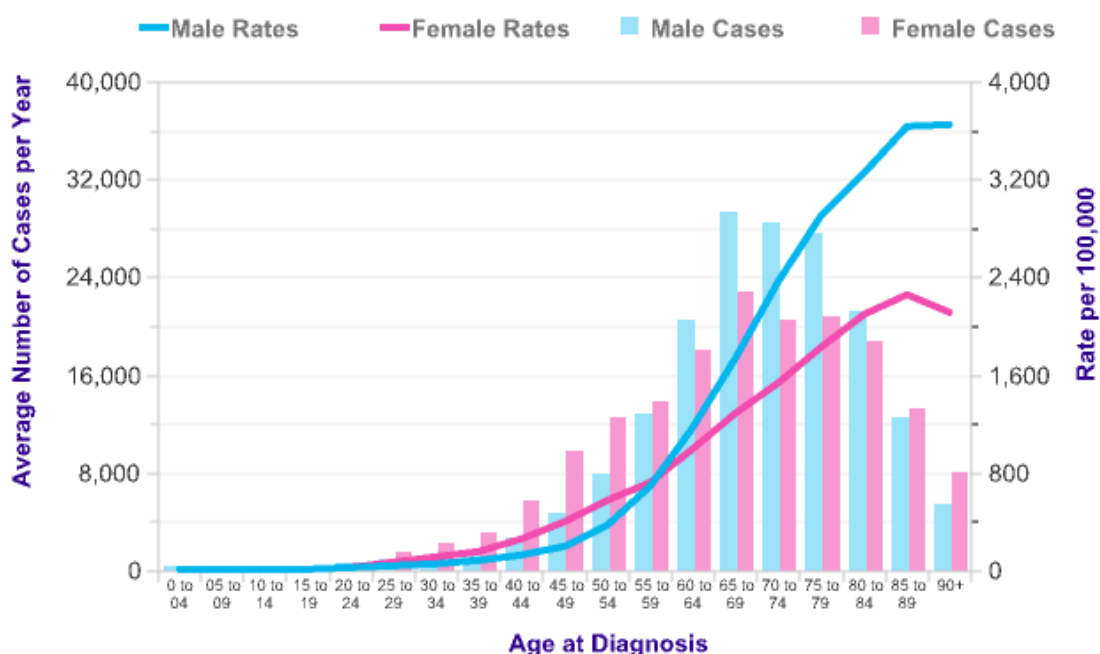


Εικόνα 2: Εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων μέσω τις φυσικής επιλογής. [8]

Κάθε μετάλλαξη οδηγεί σε ένα κύμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού που σχετίζεται με μια σταδιακή αύξηση του μεγέθους του όγκου και έτσι, η πιθανότητα για νέες μεταλλάξεις αυξάνεται (Εικόνα 2). Η συσσώρευση των αλλοιώσεων αυτών, προωθεί τους απογόνους του αρχικού κυττάρου στην ανάπτυξη του πλήρους καρκινικού φαινοτύπου. Ο φαινότυπος αυτός, συνίσταται στην εμφάνιση ενός φάσματος νέων «ανώμαλων» δεξιοτήτων που καθιστούν επιτυχημένα τα καρκινικά κύτταρα. Τρεις έως έξι τέτοιες μεταλλάξεις φαίνεται ότι απαιτούνται για την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας [9]. Ωστόσο, η πορεία αυτή, των μεταλλάξεων, μπορεί να επηρεασθεί, θετικά ή αρνητικά από αρκετούς άλλους παράγοντες, όπως η ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει τις τοξίνες ή τους ιούς από τα κύτταρά του, η ικανότητα για

αποτελεσματική επιδιόρθωση των βλαβών, η έκθεση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα, ο τρόπος ζωής, κ.α.

Με δεδομένη λοιπόν την πολυπαραγοντική φύση της νόσου, αντιλαμβανόμαστε πως ένα σύνολο πολλών διαδικασιών και πολλές φορές τυχαίων συμβάντων πρέπει να λάβουν χώρα, και συνυπολογίζοντας τους μηχανισμούς που εμπλέκονται προκειμένου ένα κύτταρο να συσσωρεύσει όλες αυτές τις μεταλλάξεις για να καταλήξει καρκινικό, είναι λογικό ότι η καρκινογένεση είναι ένα φαινόμενο που τις περισσότερες φορές απαιτεί ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα για να εμφανιστεί. Ως αποτέλεσμα, ο επιπολασμός του καρκίνου, αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ηλικία.



Εικόνα 3: Μέσος αριθμός νέων περιπτώσεων τον χρόνο και συσχετισμός τους με την ηλικία (Ηνωμένο Βασίλειο, 2012-2014) [94]

1.1.4 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Διαφορετικοί τύποι καρκίνου, απαιτούν διαφορετικούς συνδυασμούς ιδιοτήτων. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μια σειρά κρίσιμων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα:

i. Τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται λιγότερο σε σήματα από άλλα κύτταρα για την αύξηση.

Τις περισσότερες φορές, αυτό συμβαίνει επειδή περιέχουν μεταλλάξεις σε συστατικά των οδών της κυτταρικής σηματοδότησης μέσω των οποίων τα κύτταρα απαντούν σε τέτοια μηνύματα αυξητικών παραγόντων. Για παράδειγμα, μια μετάλλαξη στο γονίδιο *ras* μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ενός ενδοκυττάριου σήματος για πολλαπλασιασμό παρότι δεν υπάρχει το εξωκυττάριο σήμα το οποίο κανονικά θα ήταν απαραίτητο για την παραγωγή του.

ii. Τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο ευπαθή από τα φυσιολογικά κύτταρα σε θάνατο μέσω του αποπτωτικού μηχανισμού.

Αυτή η αποστροφή προς την αυτοκτονία, συχνά προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν τον ενδοκυττάριο μηχανισμό της απόπτωσης. Για παράδειγμα, περίπου στο 50% των καρκίνων του ανθρώπου, ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *p53*. Η πρωτεΐνη *p53*, συμμετέχει σ' έναν μηχανισμό ελέγχου που αναγκάζει τα κύτταρα είτε να σταματήσουν να διαιρούνται είτε να πεθάνουν με απόπτωση όταν το DNA τους έχει υποστεί βλάβη. Για παράδειγμα, η θραύση των χρωμοσωμάτων, αν δεν επιδιορθωθεί, γενικά αναγκάζει το κύτταρο να αυτοκτονήσει. Αν όμως το κύτταρο έχει υποστεί βλάβη στο γονίδιο *p53*, μπορεί να επιβιώσει και να συνεχίσει να διαιρείται παράγοντας πολύ ανώμαλα θυγατρικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να γίνουν ακόμη πιο κακοήγη.

iii. Τα καρκινικά κύτταρα είναι αθάνατα.

Έχουν δηλαδή την δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου, όταν υποβάλλονται σε καλλιέργεια, πραγματοποιούν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, περίπου 50 (όριο Hayflick), και μετά σταματούν οριστικά, μάλλον επειδή έχουν βραχυνθεί πάρα πολύ τα τελομερίδια στα δύο άκρα των χρωμοσωμάτων τους. Τα καρκινικά κύτταρα παραβιάζουν αυτό το όριο επανενεργοποιώντας την παραγωγή της τελομεράσης, του ενζύμου που διατηρεί το μήκος των τελομεριδίων.

iv. Τα καρκινικά κύτταρα είναι γενετικώς ασταθή.

Η γενετική αστάθεια προκύπτει από μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε έναν πολύ διαταραγμένο και ασταθή καρυότυπο. Οι μεταλλάξεις αυτές:

- Παρεμποδίζουν την πιστή αντιγραφή του γονιδιώματος και έτσι αυξάνουν τη συχνότητα των ίδιων των μεταλλάξεων.
- Ελαττώνουν την αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης του DNA.
- Αυξάνουν την πιθανότητα των χρωμοσωμικών θραύσεων και αναδιατάξεων.

v. Τα καρκινικά κύτταρα μεθίστανται.

Αυτό συχνά οφείλεται στο γεγονός ότι δεν διαθέτουν ειδικά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (π.χ. καντερίνες) που συγκρατούν υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα στη σωστή τους θέση, εμφανίζοντας έτσι παθολογική διεισδυτικότητα. Επίσης, φαίνεται πως τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκφράζουν και να εκκρίνουν ειδικά ένζυμα (μεταλλοπρωτεϊνάσες) που διασπούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο στην μετάσταση.

vi. Τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν όταν βρεθούν σε έκτοπη θέση δημιουργώντας μεταλλάξεις.

Ενώ τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα αν βρεθούν σε ξένους ιστούς πεθαίνουν. Μέχρι και σήμερα, δεν είναι πλήρως γνωστές ποιες μεταλλάξεις προσδίδουν αυτή την ικανότητα.

1.1.5 Τα είδη των όγκων

Η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή του καρκίνου εξαρτάται από τον ακριβή προσδιορισμό κάθε όγκου. Καρκίνοι που αναπτύσσονται στους διάφορους ιστούς, έχουν την τάση να συμπεριφέρονται και διαφορετικά. Γενικά υπάρχουν τρεις τύποι κακοήθων όγκων που αναπτύσσονται σε τρία είδη ιστών.

Καρκινώματα: Αναπτύσσονται στους ιστούς που καλύπτουν την επιφάνεια ή την εσωτερική μεμβράνη των οργάνων και το επιθήλιο. Πολλοί επιθηλιακοί καρκίνοι αναπτύσσονται σε ένα όργανο που εκκρίνει κάποια ουσία.

Σαρκώματα: Είναι όγκοι των μαλακών ιστών ή των οστών. Αναπτύσσονται σε κάθε τμήμα του υποστηρικτικού ή συνδετικού ιστού, στους μυς, τα νεύρα, τους τένοντες ή τα αιμοφόρα αγγεία. Οπουδήποτε στο σώμα μας υπάρχει υποστηρικτικός ή συνδετικός ιστός μπορεί να αναπτυχθεί σάρκωμα (Όπως λόγω χάρη οστεοσάρκωμα, χονδροσάρκωμα, ινοσάρκωμα, μυοσάρκωμα και αγγειοσάρκωμα). Στο ίδιο όργανο του που μπορεί να αναπτυχθεί καρκίνωμα είναι δυνατόν να αναπτυχθεί και σάρκωμα εφόσον το όργανο περιέχει συνδετικό ιστό. Στο πάγκρεας λόγω χάρη, όπου υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία, αν σε ένα κύτταρο του τοιχώματος του αιμοφόρου αγγείου αναπτυχθεί όγκος, θα πρόκειται για σάρκωμα παρόλο που βρίσκεται στο πάγκρεας.

Λεμφώματα και λευχαιμίες: Αναπτύσσονται στους λεμφαδένες ή στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα Λεμφώματα (λεμφοσαρκώματα) είναι όγκοι που σχηματίζονται στους λεμφαδένες. Σχεδόν πάντοτε είναι κακοήθης. Ένα είδος του όγκου της κατηγορίας αυτής είναι η νόσος του Hodgkin, ενώ όλοι οι υπόλοιποι όγκοι της ίδιας κατηγορίας αναφέρονται ως λεμφώματα μη-Hodgkin. Υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες της νόσου του Hodgkin και των μη-Hodgkin λεμφωμάτων. Οι λευχαιμίες είναι καρκίνοι των λευκών αιμοσφαιρίων και παίρνουν το όνομά τους από τον τύπο των λευκών αιμοσφαιρίων που προσβάλλονται. Τα πλασματοκυτταρικά μυελώματα (πολλαπλούν μυέλωμα) είναι καρκίνος των πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών [10].

1.1.6 Τα αίτια του καρκίνου (ο ρόλος των γονιδίων).

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες και σημαντικές εξελίξεις στην έρευνα του καρκίνου, υπήρξε η ανακάλυψη ότι ορισμένα γονίδια ευνοούν την ανάπτυξη καρκίνου. Δυο είναι οι κύριες κατηγορίες των γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση του καρκίνου:

- Τα ογκογονίδια (oncogenes), και
- Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes) και

1.1.6.1 Τα ογκογονίδια

Είναι μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων (των πρώτο-ογκογονιδίων) που οδηγούν τα φυσιολογικά κύτταρα σε υπερβολική ανάπτυξη και σε μετατροπή τους σε καρκινικά κύτταρα. Πρόκειται για μεταλλάξεις που αφορούν συγκεκριμένα γονίδια του κυττάρου που ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια (τα πρωτο-ογκογονίδια σημειώνονται με το πρόθεμα “c”). Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γονίδια που φυσιολογικά ελέγχουν το πόσο συχνά, και το πότε, ένα κύτταρο θα διαιρεθεί, καθώς και το βαθμό με τον οποίο θα διαφοροποιηθεί. Όταν ένα τέτοιο γονίδιο μεταλλαχθεί, είναι δυνατό να γίνει δια παντός “διεγερμένο” πράγμα που σημαίνει ότι το σήμα για κυτταρική αύξηση και διαίρεση θα δίνεται διαρκώς, γεγονός που οδηγεί σε καρκίνο. Η οδός για τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη ξεκινά με κάποιον αυξητικό παράγοντα να αγκιστρώνεται σε έναν κυτταρικό υποδοχέα. Το σήμα από τον υποδοχέα αποστέλλεται μέσω ενός μετατροπέα σήματος (*signal transducer*) και παράγεται ένας παράγοντας μεταγραφής (*transcription factor*) που προκαλεί τελικώς, την διαίρεσή του κυττάρου. Αν ανιχνευθεί οποιαδήποτε ανωμαλία, το κύτταρο προχωρά σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Σήμερα αναγνωρίζονται περισσότερα από 100 ογκογονίδια και αναμφίβολα θα ανακαλυφθούν πολύ περισσότερα στο μέλλον. Οι επιστήμονες τα έχουν διαχωρίσει σε πέντε διαφορετικές τάξεις:

i. Αυξητικοί Παράγοντες

Αυτά τα ογκογονίδια, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που διεγείρουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Ένα παράδειγμα τέτοιου ογκογονιδίου, είναι το ογκογονίδιο *sis* (c-sis oncogene). Το γονίδιο αυτό, οδηγεί σε υπερπαραγωγή μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια ή PDGF (platelet-derived growth factor).

ii. Υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων

Αυτά τα γονίδια, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-υποδοχείς που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται από τους αυξητικούς παράγοντες. Όταν οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιηθούν, διεγείρουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Συγκεκριμένες μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων προκαλούν την μόνιμη διέγερσή τους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τα γονίδια απλώς ενισχύονται. Αυτό σημαίνει ότι αντί για τα συνήθη δύο αντίγραφα γονιδίων, παράγονται μερικά ακόμα με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών μορίων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται ιδιαίτερα επιρρεπή στα αυξητικά σήματα. Τα πιο γνωστά παραδείγματα ενισχυμένων γονιδίων υποδοχέων αυξητικών παραγόντων είναι τα ErbB-1 (epidermal growth factor receptor-EGFR) και ErbB-2 (human epidermal growth factor receptor 2 - HER2). Η ενίσχυση του γονιδίου HER2 είναι μια σημαντική διαταραχή που απαντάται στο ένα τρίτο των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

iii. Μεταγωγείς σήματος

Τα γονίδια αυτά, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες-σήματα που αποτελούν την ενδιάμεση οδό μεταξύ, του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα και του κυτταρικού πυρήνα όπου το σήμα γίνεται δεκτό. Όπως και οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, έτσι και αυτοί μπορούν να ενεργοποιηθούν και απενεργοποιηθούν μέσω μεταλλάξεων. Ένα γνωστό τέτοιο γονίδιο είναι το γονίδιο *ras*. Διαταραχές του *ras* βρίσκονται σε πολλές μορφές καρκίνου.

iv. Μεταγραφικοί παράγοντες

Πρόκειται για τα τελικά μόρια μιας αλυσίδας που ορίζει τη διαίρεση του κυττάρου. Αυτά τα μόρια δρουν πάνω στο DNA και ελέγχουν το ποια κύτταρα είναι ενεργά στην παραγωγή RNA και πρωτεΐνης. Το πιο γνωστό από αυτά είναι το *myc*. Στον καρκίνο του πνεύμονα, τη λευχαιμία, το λέμφωμα και σε μια μεγάλη ποικιλία νεοπλασιών το *myc* συχνά ενεργοποιείται υπέρμετρα και διεγείρει την κυτταρική διαίρεση. Η ενεργοποίηση του *myc* οφειλόμενη στην t(8,14) (q24,q32) μετάθεση, που παρατηρείται στο λέμφωμα Burkitt και στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία από B-κύτταρα απορυθμίζει την έκφρασή του ώστε να χάνεται ο ιδανικός έλεγχος μεταγραφής του.

v. Ρυθμιστές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

Τα μόρια αυτά εμποδίζουν τα κύτταρα από το να διαπράξουν την προγραμματισμένη αυτοκτονία όταν γίνουν παθολογικά (απόπτωση). Όταν τα γονίδια γίνουν υπερενεργά, τότε εμποδίζεται η διαδικασία της φυσιολογικής απόπτωσης. Αυτό οδηγεί στην υπερβολική ανάπτυξη των παθολογικών κυττάρων, που μπορεί να γίνουν νεοπλασματικά. Το πιο καλά περιγραφόμενο τέτοιο γονίδιο, είναι το *bcl-2* και συχνά απαντάται σε κύτταρα λεμφώματος. Καθώς μαθαίνουμε όλο και περισσότερα σχετικά με τα ογκογονίδια, θα μπορέσουν να αναπτυχθούν φάρμακα για την αναστολή ή διακοπή της δράσης τους. Πολλά φάρμακα με στόχο την καταστολή των ογκογονιδίων σήμερα εμφανίζονται ως δυνητικά αντινεοπλασματικά φάρμακα.

1.1.6.2 Τα Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Είναι φυσιολογικά γονίδια που καταστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, βοηθούν την επιδιόρθωση των λαθών του DNA και που καθορίζουν την απόπτωση των κυττάρων. Όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δε λειτουργούν επαρκώς, τότε τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν ανεξέλεγκτα, γεγονός που θα οδηγήσει σε καρκίνο. Περίπου 30 ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αναγνωριστεί, όπως τα *p53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *APC*, και *RBI*. Σημαντική διαφορά μεταξύ των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ότι τα πρώτα προέρχονται από την ενεργοποίηση των πρώτο-

ογκογονιδίων, ενώ τα δεύτερα προκαλούν καρκίνο όταν απενεργοποιηθούν, όταν δηλαδή χαθεί η λειτουργία τους. Άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ογκογονιδίων αναπτύσσεται από μεταλλάξεις φυσιολογικών κυττάρων (πρωτογονιδίων) κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου (επίκτητες μεταλλάξεις). Αντιθέτως, οι διαταραχές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είναι μεταλλάξεις που καταστρέφουν τη λειτουργία του γονιδίου. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι γενικά υπολειπόμενες, δηλαδή προτού εκδηλωθεί κάποιο αποτέλεσμα, πρέπει να χαθούν η να αδρανοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ανακαλύφθηκαν από γενετικές μελέτες. Σποραδικά, ορισμένοι άνθρωποι έχουν κληρονομήσει μία μετάλλαξη σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Μολονότι ένα αντίγραφο του γονιδίου επαρκεί για τη φυσιολογική συμπεριφορά του κυττάρου, τα κύτταρα αυτών των ανθρώπων απέχουν μόλις μία μετάλλαξη πλέον (στο δεύτερο-φυσιολογικό αλληλόμορφο), από την πλήρη απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου. Έτσι, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να κληρονομηθούν. Επειδή ο αριθμός των επιπρόσθετων μεταλλάξεων που απαιτούνται για να αναπτυχθεί ο καρκίνος είναι πλέον μικρότερος, ο καρκίνος συμβαίνει με υψηλότερη συχνότητα και, κατά μέσο όρο, σε μικρότερη ηλικία (σπάνια σε παιδική ηλικία).

Οι διάφοροι τύποι των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι:

ι. Γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση

Μερικά ογκοκατασταλτικά γονίδια βοηθούν στον έλεγχο της κυτταρικής αναπαραγωγής και ανάπτυξης. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RBI) αποτελεί παράδειγμα ενός τέτοιου γονιδίου. Οι διαταραχές του RBI γονιδίου μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο του οφθαλμού, αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου σε βρέφη. Όλα τα γονίδια βρίσκονται ανά ζεύγη, σε δύο αλληλόμορφα χρωμοσώματα. Όταν η κληρονομούμενη μετάλλαξη του RBI γόνου αφορά στον ένα αλληλόμορφο γόνο, τότε δεν εμφανίζεται καρκίνος, και το άτομο που φέρει τη μετάλλαξη θεωρείται ετεροζυγώτης για τη νόσο. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παιδιού, μια τυχαία μετάλλαξη μπορεί να συμβεί στο φυσιολογικό αντίγραφο του RBI γόνου και τότε θα εκδηλωθεί η νόσος του ρετινοβλαστώματος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται, *απώλεια της ετεροζυγωτίας* και βρίσκει εφαρμογή στις περισσότερες διαταραχές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

ii. Γονίδια που επιδιορθώνουν το DNA

Μια δεύτερη ομάδα ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Κάθε φορά που ένα κύτταρο ετοιμάζεται για κυτταρική διαίρεση, θα πρέπει να διπλασιάσει το DNA του, διαδικασία που δεν είναι πάντα τέλεια, καθώς είναι δυνατόν να συμβούν λάθη αντιγραφής. Τα γονίδια αυτά, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, οι οποίες λαμβάνουν μέρος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και εξασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής του DNA διατηρώντας έτσι την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Όταν δεν δουλεύουν επαρκώς, τότε διαφεύγουν μεταλλάξεις που επιτρέπουν την παραγωγή ογκογονιδίων και παθολογικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα γονίδια που κωδικοποιούν τον οικογενή μη πολυποειδή καρκίνο του παχέος εντέρου. Όταν τα γονίδια δεν επιδιορθώσουν τα λάθη του DNA, τότε εμφανίζεται η συγκεκριμένη νεοπλασία.

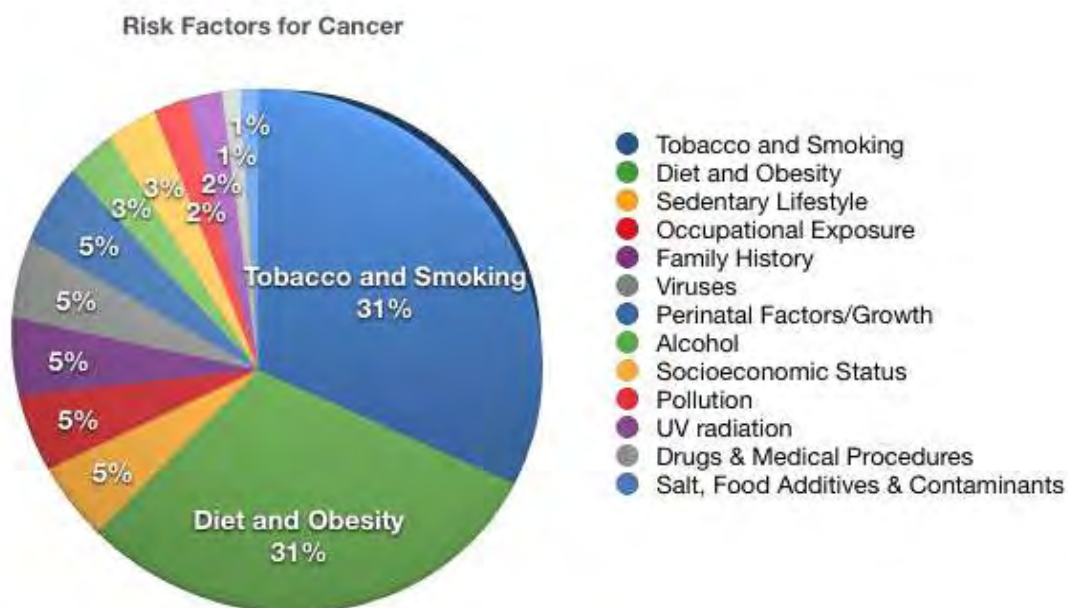
iii. Γονίδια που προκαλούν κυτταρική απόπτωση

Όταν υπάρχει τέτοια βλάβη στο DNA ενός κυττάρου που είναι πολύ μεγάλη για να αποκατασταθεί από τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, τότε το γονίδιο *p53* είναι υπεύθυνο να οδηγήσει το κύτταρο στην αυτοκτονία μέσω κυτταρικής της απόπτωσης. Αν το *p53* δε δουλεύει ικανοποιητικά, τότε κύτταρα με σοβαρές βλάβες στο DNA, συνεχίζουν να αναπτύσσονται με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου. Οι διαταραχές του *p53* είναι καμιά φορά κληρονομούμενες, όπως στο σύνδρομο Li-Fraumeni. Τα άτομα με σύνδρομο LFS έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ενός αριθμού νεοπλασιών, όπως καρκίνου των μαλακών μορίων και του εγκεφάλου, οστεοσάρκωμα, και λευχαιμία. Πολλοί σποραδικοί (μη κληρονομούμενοι όγκοι) καρκίνοι, όπως καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού καθώς και άλλοι όγκοι που φέρουν μεταλλαγμένο *p53* εντός του όγκου. [11] [12] [13]

1.1.7 Παράγοντες καρκινογένεσης

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας [14], οι κυριότεροι παράγοντες που ευθύνονται για την εμφάνιση καρκίνου είναι (με σειρά σημαντικότητας):

- Το κάπνισμα
- Η κακή διαίτα και η παχυσαρκία
- Η έλλειψη φυσικής κατάστασης – καθιστική ζωή
- Εργασιακό περιβάλλον και έκθεση σε διάφορους παράγοντες
- Το οικογενειακό ιστορικό
- Η μόλυνση από ιούς
- Περιγεννητικοί παράγοντες
- Το Αλκοόλ
- Το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο
- Η περιβαλλοντική ρύπανση
- Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία
- Τα φάρμακα
- Τα πρόσθετα των τροφίμων



1.1.7.1 *Η Διατροφή*

Αν και τα συμπεράσματα για το ρόλο των συστατικών των τροφίμων στην πρόκληση καρκίνων στον άνθρωπο είναι σύνθετα, τα περισσότερα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η διατροφή αποτελεί σημαντικό εξωγενή παράγοντα νοσηρότητας και καρκινογένεσης [15]. Υπάρχουν πολλές έρευνες που επιβεβαιώνουν ότι τα συστατικά των τροφίμων είναι υπεύθυνα για διάφορους τύπους καρκίνου αλλά και για την καρκινογόνο δράση τους [16] [17] [18]. Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών ωστόσο, φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο καρκινογένεσης πιθανόν λόγω της αντικαρκινογόνου δράσης των αντιοξειδωτικών [19]. Ο περιορισμός των θερμίδων, καθώς και της κατανάλωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο καρκινογένεσης η βλαβών στο DNA [20] [21]. Η κατανάλωση ζωικού λίπους και ερυθρού κρέατος, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, και του προστάτη [22]. Σημαντική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί, μεταξύ του καρκίνου του παχέος εντέρου και κατανάλωσης κρέατος [23]. Το μαγείρεμα φαγητών είναι αιτία εμφάνισης καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ουσιών σε σημαντικές συγκεντρώσεις τα τρόφιμα [24]. Η κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών, σε συνεργική δράση με το κάπνισμα συμβάλει στην ανάπτυξη καρκίνου του οισοφάγου, του παχέος εντέρου, του μαστού κλπ [23] [25].

1.1.7.2 *Το Κάπνισμα*

Ο καπνός του τσιγάρου είναι ο κυριότερος εξωγενής παράγοντας καρκινογένεσης στον άνθρωπο και επιδρά σε συνέργεια με άλλες καρκινογόνες ουσίες. [26]. Η σχέση καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα είναι γνωστή από πολυάριθμες επιδημιολογικές και άλλες μελέτες [27]. Το κάπνισμα είναι υπεύθυνο και για άλλους τύπους καρκίνου όπως της ουροδόχου κύστης, του φάρυγγα, του στομάχου, του οισοφάγου κ.λπ. Εκτός από καρκίνους το κάπνισμα και το παθητικό κάπνισμα αποτελούν την πρωτογενή αιτία για τους περισσότερους πρόωρους θανάτους και από άλλα είδη νοσημάτων [28].

1.1.7.3 *Αναπαραγωγικό σύστημα και σεξουαλική συμπεριφορά*

Οι ορμονικές αλλαγές που επέρχονται από τη σεξουαλικότητα, την εγκυμοσύνη, τον θηλασμό, την ηλικία της τεκνοποίησης κ.λπ., έχουν σημαντική επίδραση και ιδιαίτερα στις γυναίκες. Οι διάφοροι τύποι καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού, του

ενδομητρίου, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας, αποτελούν τις αιτίες για το 30% όλων των θανάτων από κακοήθεις νεοπλασίες στις αναπτυγμένες χώρες [29]. Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι σε μεγάλο ποσοστό οφείλονται στη σεξουαλική δραστηριότητα και στις ορμονικές μεταβολές κατά την εγκυμοσύνη [30]

1.1.7.4 Αλκοόλ και οινοπνευματώδη ποτά

Πολυάριθμες έρευνες διαπιστώνουν ότι η κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών, αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του στόματος του οισοφάγου και του φάρυγγα, ενώ η κίρρωση του ήπατος (συχνά προκαλούμενη από αλκοολισμό) είναι αιτία για την εμφάνιση κακοήθων νεοπλασμάτων στο ήπαρ [31]. Επίσης είναι γνωστή η συνεργική δράση καπνίσματος και αιθυλικής αλκοόλης των ποτών [32].

1.1.7.5 Ρύπανση του περιβάλλοντος

Η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ρύπανση του νερού, των τροφίμων, του εδάφους κ.λπ., σύμφωνα με το Ινστιτούτο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τη Μελέτη του Καρκίνου - IARC (International Agency for Research on Cancer 2013) ταξινομούνται ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο, θεωρώντας πως υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι η έκθεση σε ατμοσφαιρική ρύπανση προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα. Οι ερευνητές σημειώνουν ότι υπάρχουν επίσης ενδείξεις για αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Τα αιωρούμενα ατμοσφαιρικά σωματίδια, ένας βασικός ατμοσφαιρικός ρύπος, αξιολογήθηκαν χωριστά και ταξινομήθηκαν επίσης ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο [33] [34].

1.1.7.6 Βιομηχανικά προϊόντα

Απορρυπαντικά, φυτοφάρμακα, λιπάσματα, διαλύτες, καλλυντικά, βαφές μαλλιών, πλαστικές πρώτες ύλες, προϊόντα πολυμερισμού κ.λπ. Οι εκθέσεις στις οποίες υποβάλλεται ο άνθρωπος θεωρούνται πολύ χαμηλές και το ποσοστό θνησιμότητας από κακοήθη νεοπλάσματα είναι μικρότερο του ένα τοις εκατό.

1.1.7.7 Πρόσθετα τροφίμων:

Ο κίνδυνος θεωρείται περιορισμένος λόγω των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων στα τρόφιμα. Τα επιδημιολογικά δεδομένα δεν τεκμηριώνουν την άποψη του υψηλού κινδύνου, ενώ ορισμένα προϊόντα έχουν και αντιοξειδωτικές ικανότητες.

1.1.7.8 Ακτινοβολίες

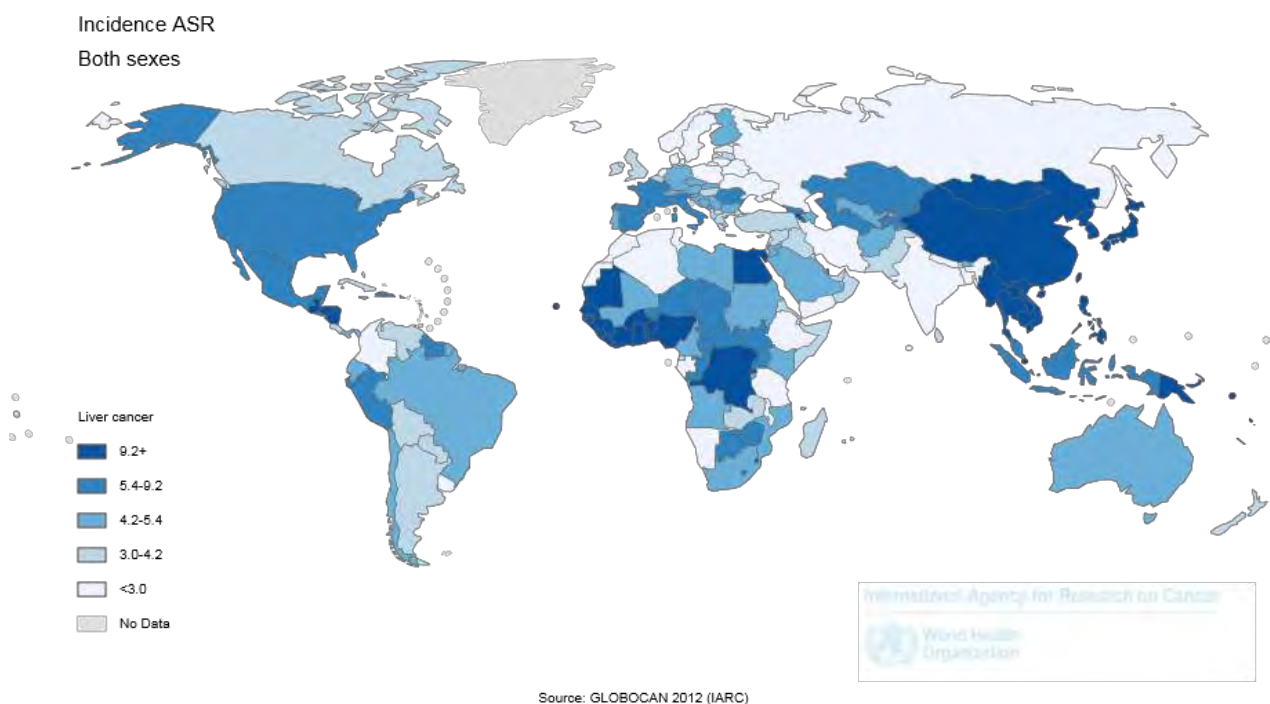
Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες α, β, γ, και οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία (uv), και η ηλιακή ακτινοβολία έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν καρκίνου στον άνθρωπο. Επίσης, τα κακοήγη μελανώματα (που προέρχονται από μεγάλης διάρκειας έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία), παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της τελευταίες δεκαετίες [35].

1.1.7.9 Ιοί και Λοιμώξεις

Είναι γνωστός ο συσχετισμός ορισμένων ιών και λοιμώξεων, ως αίτιες που οδηγούν σε καρκίνο. Για παράδειγμα, οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C, είναι αιτίες χρόνιας λοίμωξης, και οδηγούν σε καρκίνο του ήπατος [36]. Το βακτήριο *Helicobacter Pylori*, προκαλεί καρκίνο του στομάχου, ενώ ο ιός Human Papilloma Virus – HPV, είναι αιτία του καρκίνου της τραχήλου της μήτρας [37]. Τέλος, οι αφλατοξίνες σε συνεργεία με τη χρόνια ηπατίτιδα αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του ήπατος [38] [39].

1.1.8 Ο καρκίνος του ήπατος

Ο καρκίνος του ήπατος είναι μια νόσος της οποίας η συχνότητα εμφάνισης ποικίλλει κατά πολύ. Σε αφρικανικές χώρες όπως είναι η Νιγηρία και το Μπενίν και ανάμεσα στους Κινέζους της Σιγκαπούρης της Ταϊβάν και της Χαβάης, η συχνότητα εμφάνισης είναι μεγάλη ενώ στις ηπειρωτικές Ηνωμένες Πολιτείες και στη Δυτική Ευρώπη, ο πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος είναι σχετικά σπάνιος. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο [40].



Εικόνα 4: Παγκόσμια κατανομή του καρκίνου του ήπατος για το 2012. [93]

Η νόσος σχετίζεται με τον ιό της λοιμώδους ηπατίτιδας Β, με την κακή διατροφή και με φυσικά χημικά καρκινογόνα όπως είναι η αφλατοξίνη-B1, τοξικά αλκαλοειδή από φυτά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ορισμένων εντοπίων τσαγιών, και οι νιτροζαμίνες. Η χρόνια κατάχρηση οινόπνευματος που οδηγεί σε κίρρωση (ουλοποίηση) του ήπατος αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου, ειδικά στο Δυτικό κόσμο γιατί φαίνεται ότι προδιαθέτει σε εμφάνιση καρκίνου του ήπατος .

Ο καρκίνος του ήπατος, είναι ο ενδέκατος σε σειρά, πιο συχνός τύπος καρκίνου στην Ελλάδα, ενώ είναι ο όγδοος σε θνησιμότητα [41]. Επειδή το ήπαρ παίζει ζωτικό ρόλο στην απομάκρυνση των τοξινών από το αίμα, ο καρκίνος του προκαλεί σοβαρότατα μεταβολικά προβλήματα. Οι ως τώρα θεραπείες του προχωρημένου καρκίνου του ήπατος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και ο κύριος στόχος της είναι η ανακούφιση από τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη νόσο.

1.1.8.1 Τύποι καρκίνου του ήπατος

Ο συχνότερος τύπος καρκίνου που προέρχεται από το ίδιο το ήπαρ - και αναφέρεται ως πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος - αναπτύσσεται μέσα στα ηπατικά κύτταρα και ονομάζεται ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Σπανιότερα αναπτύσσονται όγκοι από τα αγγεία του ήπατος (αιμαγγειοενδοθηλίωμα), από άλλους αδένες του (αδενοκαρκίνωμα), ή από τον συνδετικό ιστό του (σάρκωμα, αγγειοσάρκωμα). Ένας ασυνήθιστος τύπος ηπατοκυτταρικού καρκινώματος που ονομάζεται ινοπεταλιώδης, τείνει να προσβάλλει νεαρές γυναίκες. Οι όγκοι που αναπτύσσονται στα χοληφόρα ονομάζονται χολαγγειοκαρκινώματα.

Συνήθως ο καρκίνος στο ήπαρ οφείλεται σε διασπορά από άλλο όργανο, είναι δηλαδή μεταστατικός.

1.1.8.2 Πώς διασπείρεται ο καρκίνος του ήπατος

Οι καρκίνοι του ήπατος διασπείρονται σε άλλες περιοχές μέσω του λεμφικού συστήματος ή αιματογενώς. Συνήθως προσβάλλουν αρχικά τους λεμφαδένες του ήπατος (πυλαίοι ηπατικοί λεμφαδένες) και κατόπιν επεκτείνονται σε άλλους λεμφαδένες ή σε άλλα όργανα όπως οι πνεύμονες και τα οστά. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να διασπαρούν στην περιτοναϊκή κοιλότητα προκαλώντας συλλογή υγρού (ασκίτης) ή μάζες σε άλλο σημείο της κοιλιάς.

1.1.8.3 Παράγοντες που προκαλούν τον καρκίνο του ήπατος

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται συχνότερα σε ήπαρ με προϋπάρχουσα βλάβη. Συνήθως, η μακροχρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β ή της ηπατίτιδας C, προηγείται της ανάπτυξης του καρκινώματος, και επομένως θεωρείται σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Η κίρρωση του ήπατος (που μπορεί να οφείλεται σε

ιογενή λοίμωξη, χρήση αλκοόλ, έκθεση σε τοξικές ουσίες ή κάποια γενετική διαταραχή του μεταβολισμού) αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, προφανώς λόγω της χρόνιας φλεγμονής του ήπατος. Πράγματι, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, εκτιμάται ότι ένα ποσοστό 5% όλων των ασθενών με κίρρωση ήπατος θα αναπτύξουν καρκίνο του ήπατος. Αντίθετα, το 50% με 80% όλων των ασθενών με καρκίνο ήπατος έχουν κίρρωση. Ορισμένες χημικές ουσίες συνοδεύονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος. Τέτοια σύνδεση έχει τεκμηριωθεί για τον φυτικό μύκητα (αφλατοξίνη) που εμπεριέχεται στο φυσιολογικό διαιτολόγιο κάποιων περιοχών της Αφρικής. Η από του στόματος λήψη στεροειδών ουσιών αυξάνει επίσης τον κίνδυνο.

Παρακάτω αναφέρονται συνολικά οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του ήπατος:

- Σε όλο τον κόσμο οι άνδρες αναπτύσσουν καρκίνο του ήπατος σε διπλάσιο ποσοστό από τις γυναίκες.
- Η χρόνια ιογενής ηπατίτιδα Β και/ή ηπατίτιδα C με ή χωρίς συνοδό κύρωση. Η συνηθέστερη οδός μετάδοσης της ηπατίτιδας Β και C είναι οι μεταγγίσεις αίματος ή το τρύπημα από βελόνα. Επειδή η ηπατίτιδα Β μεταδίδεται και από τη μητέρα στο παιδί κατά την κύηση ή τον τοκετό, καθώς και κατά τη σεξουαλική επαφή, δεν είναι σπάνιο να αναπτυχθεί καρκίνος του ήπατος στα μέλη μιας οικογένειας αφού το μολυνθούν από τον ιό της ηπατίτιδας Β.
- Η κίρρωση του ήπατος οποιασδήποτε αιτιολογίας, λόγω χάρη αλκοολική βλάβη του ήπατος ή συγγενείς διαταραχές του μεταβολισμού όπως η αιμοχρωμάτωση ή η συγγενής έλλειψη ενζύμων.
- Έκθεση σε αφλατοξίνη, έναν μολυσματικό μύκητα που βρίσκεται στο έδαφος της Αφρικής.
- Η έκθεση σε ατμούς από βινυλοχλωρίδιο ή Thorotrast (σκιαγραφικό υλικό ακτινολογικών εξετάσεων που δεν χρησιμοποιείται πλέον) αυξάνει τον κίνδυνο να αναπτυχθεί αγγειοσάρκωμα του ήπατος, όχι όμως ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.
- Είναι γνωστό πως η χρήση αναβολικών στεροειδών ουσιών, όπως συμβαίνει με τους αρσιβαρίστες ή άλλους αθλητές, αυξάνει τον κίνδυνο να αναπτυχθούν

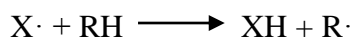
καλοήθεις ηπατικοί όγκοι και επιπλέον επιβαρύνει την επίπτωση του καρκίνου του ήπατος.

- Η θεραπεία με οιστρογόνα, όπως τα αντισυλληπτικά που λαμβάνονται από το στόμα, μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο, αν και κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί [10].

1.2 Ελεύθερες ρίζες, δραστικές οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις (ROS) και μηχανισμοί καρκινογένεσης.

Ελεύθερες ρίζες καλούνται μόρια ή τμήματα μορίων ή στοιχεία που φέρουν ενα μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχουν δύο ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια, αλλά να απέχουν σημαντικά μεταξύ τους ώστε να μην υπάρχει σύζευξη.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς, δραστικές ενώσεις και τείνουν να αποσπών ένα άτομο με ηλεκτρόνιο για τη δημιουργία ενός ζεύγους ηλεκτρονίων. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με χημικά μόρια αποσπώντας ένα τμήμα τους, κυρίως άτομο υδρογόνου, ενώ ιδιαίτερη σημασία έχει η απόσπαση αυτή από οργανικές ενώσεις (RH):



Οι αντιδράσεις αυτές συνήθως δημιουργούν αλυσιδωτή αντίδραση που μπορεί σε βιολογικά συστήματα να προκαλέσουν τοξικές βλάβες ή θραύσεις σε βιομόρια (π.χ. υπεροξείδωση λιπιδίων στις μεμβράνες των κυττάρων ή θραύσεις κλώνων στο DNA).

Το είδος των οξυγονούχων ελευθέρων ριζών που απαντούν σε κυτταρικές διεργασίες φέρει το μονήρες ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο αλλά υπάρχουν και ρίζες με το μονήρες ηλεκτρονίου σε άτομο άνθρακα, αζώτου, ή θείου. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες είναι:

- Ρίζα υδροξυλίου (hydroxyl radical), $\text{HO}\cdot$
- Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος (superoxide anion), $\text{O}_2^{\cdot-}$
- Ρίζα υδροϋπεροξυλίου (hydroperoxyl radical), $\text{HOO}\cdot$
- Ρίζα αλκοξυλίου (alkoxyl radical), $\text{RO}\cdot$
- Ρίζα υπεροξυλίου (peroxyl radical), $\text{ROO}\cdot$
- Ρίζα ακυλοξυλίου (acyl radical), $\text{RC=OO}\cdot$
- Ρίζα ακυλοϋπεροξυλίου (acylperoxyl radical), $\text{RC=OOO}\cdot$
- Ρίζα αρυλοξυλίου (aryloxyl radical), $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot$ ή $\text{ArO}\cdot$

- Ρίζα αρυλοϋπεροξυλίου (arylperoxy radical), $\text{ArOO}\cdot$
- Ρίζα βενζο-ημικινόνης (semiquinone radical), $\text{HO-C}_6\text{H}_5\text{-O}\cdot$
- Ρίζα θείυλο- (thiyl radical), $\text{RS}\cdot$
- Ρίζα μεθυλίου (methyl radical), $\cdot\text{CH}_3$
- Ρίζα τριτοταγούς άλκυλο- ομάδας (tert-Butyl radical), $(\text{CH}_3)_3\text{C}\cdot$
- Ρίζα φαινοξυλίου (phenoxy radical), $\text{C}_6\text{H}_5\text{-O}\cdot$
- Ρίζα διαλκυαμίνυλο- ομάδας (dialkylaminy radical), $\text{R}_2\text{N}\cdot$

Κάποιες άλλες ελεύθερες ρίζες με σημαντικό ρόλο σε βιολογικούς οργανισμούς είναι τα οξειδία του αζώτου ($\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$). Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τις κυτταρικές διεργασίες από ενδογενείς φυσιολογικούς μηχανισμούς ή κάτω από την επίδραση εξωτερικών επιδράσεων.

Οι οξυγονούχες δραστικές ενώσεις-ROS (reactive oxygen species), δεν είναι ελεύθερες ρίζες, παρόλα αυτά, έχουν τη δυνατότητα πολύ εύκολα, αντιδρώντας με άλλα μόρια, να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Πολλές από αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο σε οξειδωτικές διεργασίες στα βιολογικά συστήματα. Τέτοιες είναι:

- Το όζον, O_3
- Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2
- Το νιτρώδες οξύ, HNO_2
- Το υποχλωριώδες οξύ, HOCl
- Το υπεροξυνιτρώδες αión (peroxynitrite), $\text{O=N-O-O}\cdot$
- Το υπεροξυνιτρώδες οξύ, ONOOH και
- Το νιτρόζυλο-κατιόν (nitrosyl cation), NO^+

Οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες (oxygen free radicals) και οι διάφορες οξειδωτικές οξυγονούχες ενώσεις, οι οποίες συνολικά καλούνται δραστικά οξυγονούχα είδη ενώσεων (ROS) παίζουν σημαντικό ρόλο στους αερόβιους οργανισμούς. Επιπλέον

υπάρχουν και αζωτούχες, χλωριούχες, και άλλες ενώσεις που είναι ελεύθερες ρίζες ή έχουν ισχυρή οξειδωτική ικανότητα. Οι ελεύθερες ρίζες, προσαρμόστηκαν με την εξέλιξη των ζωντανών οργανισμών μέσα από χρήσιμες μεταβολικές διεργασίες σε εξαιρετικά σημαντικές βιολογικές ουσίες. Μεταφέρουν ενέργεια και μεταβολίζουν το οξυγόνο σε συνδυασμό με το νερό και την ηλιακή ακτινοβολία για τις ανάγκες της διατροφής και ανάπτυξης με μεγάλο αριθμό ενζυματικών διεργασιών. Ο ενδοκυτταρικός μεταβολισμός των αερόβιων οργανισμών, βασίζεται στη ροή ηλεκτρονίων με τη συμμετοχή φλαβο- και αίμο- πρωτεϊνών, αλλά κατά την πορεία δημιουργούνται και ορισμένες διαρροές μικρής ποσότητας ηλεκτρονίων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών οξυγονούχων ουσιών (ROS) και ελεύθερων ριζών με βασικό υλικό το μοριακό οξυγόνο [42].

Το οξυγόνο O_2 είναι απαραίτητο αλλά και συγχρόνως τοξικό μόριο λόγω της οξειδωτικής του δράσης. Παρ' όλα αυτά, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει με την εξέλιξη ευέλικτους και αποτελεσματικούς αμυντικούς, αντιοξειδωτικούς, μηχανισμούς για κάθε στάδιο του μεταβολισμού τους.

Εκτός όμως από τους ενδογενείς μεταβολικούς κύκλους, και τις διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις, οι βιολογικοί οργανισμοί αναπνέουν και τρέφονται με εξωγενή υλικά. Οι εξωγενείς αυτές αέριες χημικές ενώσεις που προσλαμβάνονται κατά την αναπνοή, και τα διάφορα θρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιούνται τη διατροφή των βιολογικών οργανισμών, αντιδρούν με τα ενζυμικά συστήματα στην αλυσίδα του μεταβολισμού και μεταβολίζονται προς ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες. Αν και η αλυσίδα μεταβολισμού λειτουργεί με συνέπεια υπάρχει και η αναπόφευκτη διαρροή ηλεκτρονίων στις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες που ανάγουν το οξυγόνο σε υπεροξειδικό ανιόν (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$) το οποίο ενδοκυτταρικά είναι αρκετά σταθερό ριζικό ανιόν.

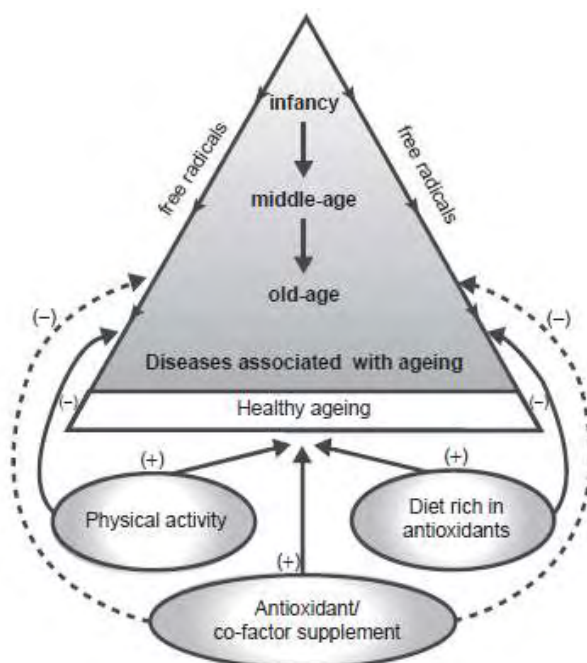
Το υπεροξειδικό ανιόν μετατρέπεται εύκολα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), φυσιολογική οξυγονούχα ένωση που διασπάται εύκολα μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με μεταλλικά ιόντα, παράγοντας στην εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($HO\cdot$), που είναι υπεύθυνη για βλάβες στο DNA των κυττάρων και σε άλλα βιομόρια [43] [44].

Πολυάριθμα πειραματικά δεδομένα, δείχνουν ότι οι οξυγονούχες και οργανικές ελεύθερες ρίζες λόγω της δραστικότητας και της αστάθειας που τις χαρακτηρίζει αντιδρούν με βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων, τους

υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες, και τα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Η λιπιδική υπεροξείδωση, οι βλάβες και αλλοιώσεις οι βασικές πρωτεϊνικές αλυσίδες ενζύμων καθώς και οι θραύσεις, μεταλλάξεις, λανθασμένες αντιγραφές κ.λπ. στο DNA των κυττάρων, είναι υπεύθυνες για την έναρξη, την προαγωγή, και την μετεξέλιξη της καρκινογένεσης στους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς και για διάφορες ασθένειες φθοράς [45].

Το οξειδωτικό stress που προκύπτει από αυτές τις διεργασίες, αλλά και διεργασίες όπως οι φλεγμονές, η φαγοκυττάρωση και η γήρανση των οργανισμών, έχουν ως συνέπεια την μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ουσιών στα φυσιολογικά υγρά, αλλά και την μείωση της απόδοσης των ενζυμικών αντιδράσεων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων.

Γίνεται έτσι αντιληπτός ο σημαντικός ρόλος της διατροφής στην διατήρηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών στα φυσιολογικά υγρά αλλά και η χρήση φυτοχημικών ουσιών με υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό, ως χημειοπροφυλακτικούς παράγοντες, στην πρόληψη διεργασιών που σχετίζονται με εκφυλιστικές ασθένειες και μηχανισμούς καρκινογένεσης.



Εικόνα 5: Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά, και πώς εμπλέκονται στην γήρανση [45]

1.3 Φυτοχημικές ουσίες με αντικαρκινική δράση.

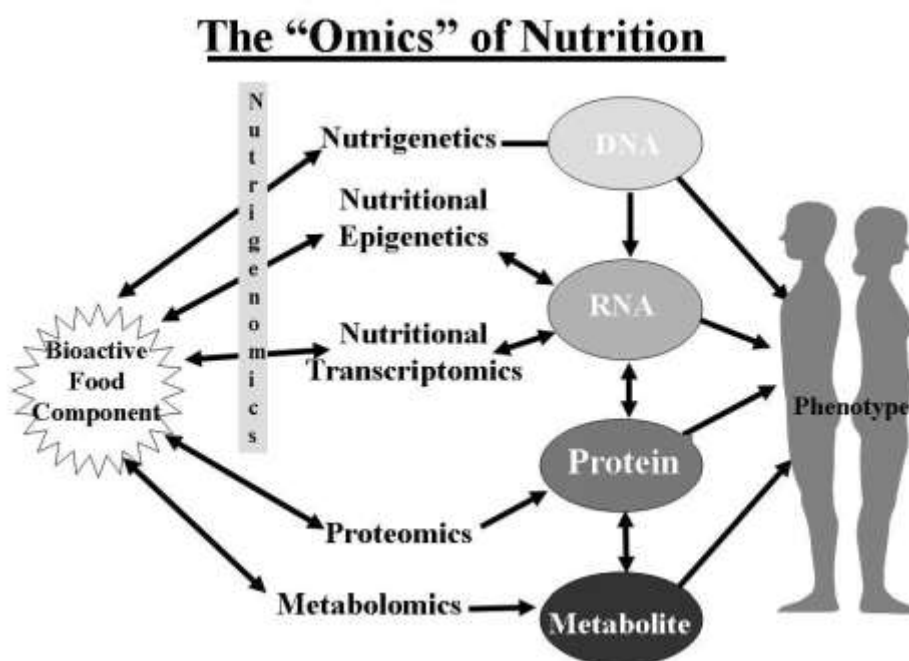
Η διατροφή είναι γνωστό ότι συμβάλλει ως εξωγενής παράγοντας στο 35 - 40% των περιπτώσεων των κακοήθων νεοπλασιών (συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας με 10%) ανάλογα με το είδος των τροφίμων που καταναλώνονται καθημερινά, ενώ υψηλή κατανάλωση φυτικών προϊόντων πλούσιων σε αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές φυτοχημικές ουσίες, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων ειδών καρκίνου [46].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει συστηματικές επιδημιολογικές έρευνες για τα διάφορα είδη καρκίνου και τη σχέση της με το είδος της διατροφής. Από τη μια πλευρά γίνεται συσχέτιση εμφάνισης καρκίνου με την υψηλή κατανάλωση ζωικών λιπών, κόκκινου κρέατος, αλατισμένων τροφίμων, αλκοολούχων ποτών, και υψηλή πρόσληψη θερμίδων που θεωρούν ότι αυξάνουν τον κίνδυνο. Ενώ στην αντίθετη πλευρά γίνεται συσχέτιση του μειωμένου κινδύνου με την υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, ελαιολάδου, προϊόντων ολικής άλεσης και χαμηλή κατανάλωση κρέατος και ζωικών λιπαρών υλών. Ορισμένοι τύποι καρκίνου όπως ο καρκίνος του στομάχου, του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, και του παγκρέατος έχει βρεθεί ότι συνδέονται άμεσα με τη διατροφή ενώ άλλοι τύποι όπως του πνεύμονα, του μαστού και του προστάτη, δεν έχουν άμεση συσχέτιση ή ο ισχυρισμός είναι στατιστικά χαμηλής σημασίας [47].

Είναι γνωστό ότι η πορεία της καρκινογένεσης είναι πολυσταδιακή και με την αλληλεπίδραση πολυάριθμων παραγόντων (ενζύμων, γονιδίων, έκφρασης ογκογονιδίων, μεταγραφής μηνυμάτων, αγγειογένεσης κ.λπ.) που σχετίζονται με τον ανθρώπινο κυτταρικό μεταβολισμό. Η διατροφή αναμφισβήτητα παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και προαγωγή της καρκινογένεσης, αλλά οι αλληλεπιδράσεις είναι εξαιρετικά πολύπλοκες. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί νέοι τομείς έρευνας όπως η διατροφική γενωμική (nutritional genomics ή nutrigenetics), διατροφική επιγενετική (nutritional epigenomics), διατροφική μεταγραφωματική (nutritional transcriptomics), πρωτεομική (proteomics) και μεταβολομική (metabolomics). Αυτές οι περιοχές της έρευνας είναι αρκετά πρόσφατες και αναδύθηκαν από την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2000 και τις πληροφορίες που μπορεί να προσφέρει, αυτή η γνώση, στην ιατρική επιστήμη σε σχέση με τη διατροφή. Πλέον είμαστε σε θέση να εξετάζουμε σε μοριακό επίπεδο το ρόλο των θρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών των τροφίμων στην καρκινογένεση, τις διαφορές του μεταβολισμού των συστατικών σε

κρίσιμους στόχους, τη συμπεριφορά των κακοήθων όγκων και τη συμμετοχή τους σε μοριακές διεργασίες κλειδιά για τα κακοήγη νεοπλάσματα.

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί (genetic polymorphisms) μπορούν να διαφοροποιήσουν τον μεταβολισμό, την απορρόφηση και το σημείο δράσης στα νουκλεϊκά οξέα (π.χ μεθυλίωση του DNA) των διατροφικών συστατικών (epigenomic events) τα οποία τελικά θα επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση, με αποτέλεσμα να επηρεασθεί η βιολογική απόκριση του οργανισμού, στα διάφορα συστατικά της διατροφής. Οι διακυμάνσεις που συμβαίνουν σε σχέση με την ικανότητα συστατικών των τροφίμων αυξήσουν ή να μειώσουν τη γονιδιακή έκφραση (nutritional transcriptomic effect), παίζουν σημαντικό ρόλο στην πορεία της καρκινογένεσης. Τέλος, μια άλλη πλευρά της μελέτης της διατροφής εξετάζει την παραγωγή όλων των πρωτεϊνών που συντίθεται από τα διάφορα είδη έμβιων όντων (proteomics) και τη διασύνδεσή τους με φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και με κυτταρικούς πρωτεϊνικούς μεταβολικούς μηχανισμούς που μπορεί να συμμετέχουν σε μηχανισμούς καρκινογένεσης.



Εικόνα 6: Μελέτη της δράσης των βιοδραστικών συστατικών των τροφών μέσω των 'omics' [48]

Καθίσταται επομένως, σήμερα δυνατή, η ανάλυση των βιοδραστικών συστατικών των τροφών και η διερεύνηση μέσω των 'omics', της σχέσης τους με την

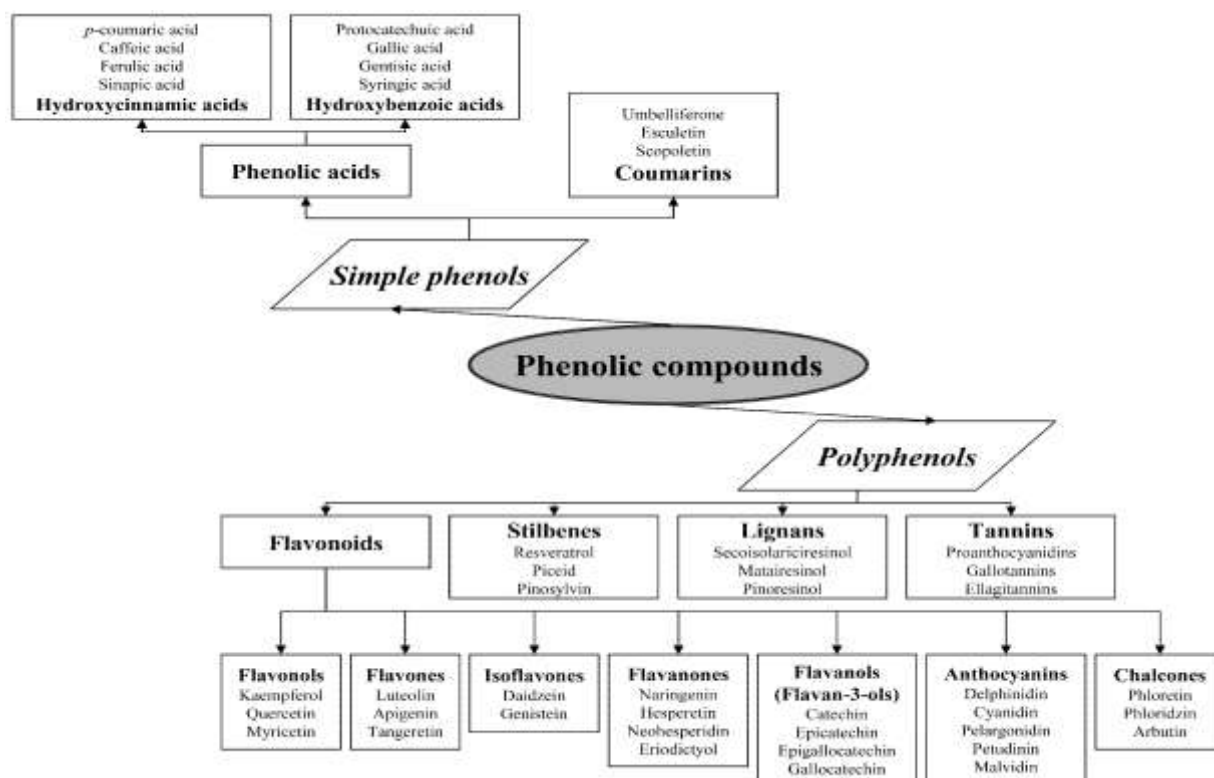
ρύθμιση γονιδίων, ενζύμων, έκφρασης ογκογονιδίων, μεταγραφής μηνυμάτων, αγγειογένεσης και άλλων παραγόντων που σχετίζονται με την καρκινογένεση σε μοριακό επίπεδο. Τελικός σκοπός των ανωτέρω, είναι αρχικά, ο καθορισμός ενός διαιτολογίου που θα μειώνει στον μέγιστο βαθμό το ρίσκο της καρκινογένεσης, και ποιο ειδικά, ο καθορισμός συγκεκριμένου κοκτέιλ συστατικών της διατροφής, που δρουν χημειοπροφυλακτικά, σε συγκεκριμένους καρκίνους, σε συγκεκριμένους ασθενείς, και σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις [48].

1.3.1 Οι κυριότερες φυτοχημικές ουσίες των τροφίμων με αντιοξειδωτική και Αντικαρκινική δράση.

Οι κυριότερες κατηγορίες φυτοχημικών ουσιών της διατροφής, ιδιαίτερα στα φρούτα και τα λαχανικά, που έχουν μελετηθεί τις τελευταίες δεκαετίες ως προς την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση τους και κατά συνέπεια στη μείωση του κινδύνου για την εμφάνιση διαφόρων ειδών κακοήθων νεοπλασιών και χρόνια νοσήματα στον άνθρωπο είναι οι πολυφαινολικές ουσίες.

1.3.1.1 ΠολυΦαινολικές ουσίες

Είναι ουσίες που φέρουν στη δομή τους ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια και διαχωρίζονται σε φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στιλβένια, κουμαρίνες και ταννίνες. Μεταξύ των φρούτων που έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών ουσιών είναι τα μήλα, τα κόκκινα σταφύλια, οι φράουλες, οι μπανάνες, τα ροδάκινα κ.λπ., ενώ μεταξύ των λαχανικών τις υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν το μπρόκολο, το σπανάκι, τα κρεμμύδια, τα καρότα, το λάχανο, τα μαρούλια, κ.λπ. Συνήθως τα φρούτα και τα λαχανικά συνεισφέρουν τα 2/3 των αντιοξειδωτικών φλαβονοειδών στη διατροφή του ανθρώπου.



Εικόνα 7: Κατηγοριοποίηση πολυφαινολικών ενώσεων

1.3.1.1.1 Φαινολικά Οξέα.

Τα φαινολικά οξέα, χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- i. **Υδροξυ-φαινολικά οξέα:** Γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ κ.λπ.
- ii. **Υδροξυ-κινναμωμικά οξέα:** p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναιπικό οξύ κ.λπ.

Τα φαινολικά οξέα, εμφανίζονται στα φρούτα και τα λαχανικά σε σύνθετες δομές όπως οι λιγνίνες και υδρολυόμενες ταννίνες, καθώς και παράγωγα σακχάρων.

1.3.1.1.2 Φλαβονοειδή.

Πάνω από 4000 φλαβονοειδή έχουν προσδιοριστεί σε διάφορα φυτικά προϊόντα. Ο γενικός τους τύπος, περιλαμβάνει δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β δακτύλιος) που ενώνονται συνήθως με οξυγονούχο ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C). Ανάλογα με τον τύπο του ετεροκυκλικού δακτυλίου, διαχωρίζονται σε:

- i. **Φλαβονόλες:** Κερκετίνη (quercetine), кемπερόλη (kaempferol), μυρισετίνη (myricetin), Φισετίνη (fisetin).
- ii. **Φλαβανόνες:** Απιγενίνη (apigenin), χρυσίνη (chrysin), λουτεολίνη (luteolin).
- iii. **Φλαβόνες:** Απιγενίνη (apigenin), χρυσίνη (chrysin), λουτεολίνη (luteolin).
- iv. **Φλαβανόλες:** Κατεχίνη (catechin), επικατεχίνη (epicatechin), επιγαλλοκατεχίνη (epigallocatechin), γαλλοκατεχίνη (gallocatechin).
- v. **Ανθοκυανίνες:** Είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές των φυτών, υπεύθυνες για τα χρώματα κόκκινο, μπλε, και βιολετί. Οι περισσότερες ανθοκυανίνες είναι μονογλυκοζίτες (monoglycosides) και διγλυκοζίτες (diglycosides) της πελαργονιδίνης (pelargonidin), κυανιδίνης (cyanidin), πεονιδίνης (peonidin),

δελφινιδίνης (delphinidin), μαλβιδίνης (malvidin), και της πελαργοζιδίνης (pelargosidin). Η βασική δομή των ανθοκυανινών, είναι το φλαβινικό κατιόν (flavylium cation). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι φράουλες που περιέχουν τον κυανιδινικό-3-γλυκοζίτη (cyaniding-3-glycoside) και το πελαργονιδινικό τριοζίδιο (pelargonidin trioside), ενώ τα γλυκά κεράσια περιέχουν την ανθοκυανίνη πεονιδίνη-3-γλυκοζίνη (peonidin-3-glycoside).

- vi. **Ισοφλαβόνες:** Αρκετά ισοφλαβονοειδή βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά, όπως η γενιστεΐνη (genistein), η νταϊζδεΐνη (daidzein), η γλυσιτεΐνη (glycitein), και η φορμονονετίνη (formononetin).

1.3.1.1.3 Στιλβένια.

Υπάρχουν διάφορες ενώσεις εκ των οποίων η πλέον γνωστή η trans-ρεσβερατρόλη (resveratrol), που βρίσκεται σε κόκκινα σταφύλια.

1.3.1.1.4 Κουμαρίνες.

Υπάρχουν πολυάριθμες ενώσεις, όπως η κουμαρίνη (cumarin), η ουμπελλιφερόνη (umbelliferone), η σκοπολετίνη (scopoletin), η φουρανοκουμαρίνη (furanocoumarin), το ψωραλένιο (psoralen), το μπερκαπτένιο (bercapten), η ξανθοτοξίνη (xanthotoxin), η ισοπιμπελίνη (isopimpinellin), κ.λπ.

1.3.1.1.5 Ταννίνες.

Είναι πολυφαινόλες των φυτών, κυρίως του τύπου φλαβαν-3-όλες (flavan-3-ols) και εστέρες με γαλλικό οξύ με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση: γαλλικός εστέρας της κατεχίνης (catechin gallate), γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (epicatechin gallate), γαλλικός εστέρας της γαλλοκατεχίνης (gallocatechin gallate), γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (epigallocatechin gallate).

1.3.1.2 Μη φαινολικές φυτοχημικές ουσίες

1.3.1.2.1 Αλκαλοειδή.

Είναι κυρίως οργανικές αζωτούχες βάσεις. Χαρακτηριστικές ενώσεις, είναι: Κοκαΐνη (cocaine), μορφίνη, κωδεΐνη, ρεξερπίνη, στρυχνίνη, εφεδρίνη, μεσκαλίνη, ατροπίνη (belladonna atropine), αναφερίνη (anaferine), λομπελίνη (lobeline), αναμπασίνη (anabesine), κ.λπ.

1.3.1.2.2 Οργανοθειούχες Ενώσεις.

Ενώσεις με αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες λόγω της παρέμβασης σε ενζυμικές αντιδράσεις. Οι κυριότερες ενώσεις είναι: Ισοθειοκυανικοί εστέρες (isothiocyanates), ινδόλες (indoles), αλλυλοϊσοθειοκυανικοί εστέρες (allylisothiocyanate), και ενώσεις του θείου (sulfur compounds).

1.3.1.2.3 Καροτενοειδή.

Είναι έγχρωμα μόρια λόγω της δομής τους, και συνήθως εμφανίζονται ως χρωστικές των φυτών. Έχουν μελετηθεί εκτενέστατα λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης και του ρόλου τους ως προ-βιταμίνες. Έχουν προσδιοριστεί πάνω από εξακόσια διαφορετικά καροτενοειδή σε φρούτα και λαχανικά. Συνήθως τα καροτενοειδή έχουν έναν ανθρακικό σκελετό με σαράντα άτομα αποτελούμενο από ισοπερονοειδείς ομάδες και δομή τους μπορεί να περιέχει ανθρακικό δακτύλιο στην μία ή και τις δύο άκρες του γραμμικού ανθρακικού σκελετού. Τα καροτενοειδή στη φυσική τους κατάσταση, εμφανίζονται σε trans μορφή. Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι οι πολλαπλοί συζυγιακοί διπλοί δεσμοί στο κέντρο της δομής του μορίου, πράγμα που τα καθιστά ικανά να απορροφούν το φως και να έχουν ιδιαίτερη χημική δραστηριότητα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: Το α-καροτένιο και β-καροτένιο (carotene), η β-κρυπτοξανθίνη (cryptoxanthin), η ζεαξανθίνη (zeaxanthin), η λουτεΐνη (lutein), η ασταξανθίνη (astaxanthin), το λυκοπένιο (lycopene), κ.λπ. Η τομάτα, το καρπούζι, τα βερίκοκα, τα καρότα, και άλλα είναι ορισμένα από τα φρούτα και λαχανικά με υψηλές συγκεντρώσεις καροτενοειδών. Η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών με απεντόπηση του μονήρους ηλεκτρονίου ανάμεσα

στους συζυγιακούς διπλούς δεσμούς του μορίου. Πολλά καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά και μειώνουν δραστικά την λιπιδική υπεροξειδωση [49] [50].

Οι φυτοχημικές αυτές ενώσεις, έχουν γίνει αντικείμενο ερευνών, τόσο για την παρουσία τους σε διάφορα φυτά και τρόφιμα, όσο και για την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση [51]. Αρκετές έρευνες έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στη συνεργική ή προσθετική αντικαρκινική δράση των φυτοχημικών ουσιών [52] [53].

1.3.2 *Φυτοχημικές ουσίες και Αντικαρκινική δράση.*

Οι πολυάριθμες έρευνες για την αντικαρκινική δράση το φυτοχημικών ουσιών σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα, έχουν εντοπίσει συγκεκριμένες δραστικότητες σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο αλλά και την ενεργοποίηση ή καταστολή ορισμένων βιολογικών συστημάτων (όπως το ανοσοποιητικό) και ρυθμίσεις ορισμένων σταδίων του μεταβολισμού [53].

- Αντιοξειδωτική δραστηριότητα, εκκαθάριση ελευθέρων ριζών και δραστικών οξυγονούχων ενώσεων (ROS), μείωση οξειδωτικού στρες.
- Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (cell proliferation).
- Ενεργοποίηση της κυτταρικής διαφοροποίησης (cell differentiation).
- Αναστολή της έκφρασης των ογκογονιδίων (inhibition of oncogene expression).
- Επαγωγή της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor suppress gene expression).
- Επαγωγή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου (cell-cycle arrest).
- Επαγωγή της απόπτωσης (apoptosis).
- Αναστολή των οδών μεταγωγής μηνυμάτων της καρκινογένεσης (inhibition of signal transduction pathways).

- Ενεργοποίηση ενζύμων (enzyme induction) και αύξηση της ενζυμικής αποτοξίνωσης (detoxification).
 - Ενεργοποίηση των ενζύμων της Φάσης II (induction of enzymes Phase II)
 - Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase)
 - Καταλάση (catalase)
 - Υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase).
- Αναστολή ενζύμων (enzyme inhibition).
 - Ένζυμα της Φάσης I, παρεμπόδιση ενεργοποίησης καρκινιγόνων ουσιών (Phase I enzyme, block activation of carcinogens).
 - Αναστολή κυκλοοξυγενασών (inhibition of cyclooxygenase-1 & 2, COX-1, COX-2).
 - Ενεργοποίηση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (nitric oxide synthase).
 - Οξείδιο της ξανθίνης (xanthine oxide).
- Ενεργοποίηση, επαύξηση και επίβλεψη των ανοσοδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος (enhancement of immune function and surveillance).
- Αντι-αγγειογένεση (anti-angiogenesis).
- Αναστολή της συγκόλλησης των κυττάρων και εισβολής (cell adhesion and invasion).
- Αναστολή της νίτρωσης και νιτροδωσης (nitration and nitrosation).
- Πρόληψη της σύνδεσης των καρκινογόνων με το DNA (DNA binding).
- Ρύθμιση του μεταβολισμού των στεροειδών ορμονών (regulation of steroid hormone metabolism).

- Ρύθμιση του μεταβολισμού των οιστρογόνων (regulation of estrogen metabolism).
- Αντιβακτηριακή και αντι-ική δράση (antibacterial & antiviral effects).

Η καρκινογένεση είναι πολυσταδιακή και πολύπλοκη διεργασία στην οποία οι οξειδωτικές βλάβες παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην εκκίνηση της δημιουργίας κακοήθων όγκων μέσω διαφόρων μηχανισμών [54]. Οι οξειδωτικές επεμβάσεις από ελεύθερες ρίζες και γενικά από ROS, προκαλούν μεταλλάξεις κλώνων ή προσθέτουν μόρια (π.χ. μεθυλομάδες) στις νουκλεοβάσεις του DNA, οι οποίες αν δεν επιδιορθωθούν, οδηγούν σε απλές και διπλές κλωνικές θραύσεις, χρωμοσωμικές μεταβολές και μεταθέσεις. Οι οξειδωτικές βλάβες αυτές έχει βρεθεί ότι μειώνονται σημαντικά ή περιορίζεται η έκτασή τους με τη λήψη αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται κυρίως στα φρούτα και τα λαχανικά. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές φυτοχημικές ουσίες μειώνουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης έχουν μελετηθεί όπως επίσης και οι αλληλεπιδράσεις τους σε διάφορα συστήματα και το μεταβολισμό [44] [55].

Οι επιστημονικές ενδείξεις από μεγάλο αριθμό ερευνών δείχνουν ότι σημαντικό μέρος των μηχανισμών του μεταβολισμού που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και πρόωρη εμφάνιση χρόνιων παθήσεων και ιδιαίτερα διαφόρων τύπων καρκίνου, είναι το οξειδωτικό στρες και οι διάφορες οξειδωτικές βλάβες σε βασικά βιομόρια. Στους μηχανισμούς αυτούς εξαιρετικά προστατευτικό ρόλο μπορούν να παίξουν οι αντιοξειδωτικές ουσίες των τροφίμων, όπως άλλωστε έχει αποδειχθεί από επιδημιολογικές μελέτες [56].

Το κλασικό μοντέλο της καρκινογένεσης περιλαμβάνει τρία στάδια: έναρξη, προαγωγή, και μετεξέλιξη. Οι βλάβες στο DNA των κυττάρων από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και η συσσώρευση μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την εξασθένηση των ενζυμικών επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA είναι καθοριστικοί παράγοντες. Αν και η ανάπτυξη τελικά κακοήθων νεοπλασιών (διαφόρων τύπων καρκίνου) στα άτομα σχετίζεται με αρκετές προσωπικές μεταβολικές διεργασίες και γενετικούς πολυμορφισμούς, οι βλάβες του DNA, και ιδιαίτερα οι οξειδωτικές βλάβες μπορούν να προληφθούν ή να αντιμετωπιστούν ικανοποιητικά με αντιοξειδωτικές και

αντιφλεγμονώδεις ουσίες που υπάρχουν άφθονες τη διατροφή του ανθρώπου. Σημαντικός αριθμός αντικαρκινικών μηχανισμών των φυτοχημικών μικροσυστατικών της διατροφής έχουν προσδιοριστεί ερευνητικά, καθώς και οι διεργασίες που προλαμβάνουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων κακοήθων νεοπλασιών. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες έρευνες *in vitro* και *in vivo* με συγκεκριμένες φυτοχημικές ουσίες των τροφίμων ή με μίγματα ή με εκχυλίσματα τροφίμων για να μελετηθούν μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης [57].

1.3.3 Μεταβολισμός των πολυφαινολικών μικροσυστατικών της διατροφής.

Η ημερήσια πρόσληψη φυτοχημικών μικροσυστατικών, ιδιαίτερα των πολυφαινολών, διαφέρει από χώρα σε χώρα ανάλογα με τις διατροφικές συμπεριφορές των ατόμων και τη συχνότητα πρόσληψης φρούτων και λαχανικών. Διάφορες μελέτες έχουν προσδιορίσει ότι καθημερινά ο άνθρωπος λαμβάνει περίπου ένα γραμμάριο πολυφαινολών και άλλων αντιοξειδωτικών μικροσυστατικών από την τροφή του. Για συγκεκριμένες κατηγορίες όπως φλαβονοειδή ή φλαβόνες και φλαβονόλες, η ημερήσια πρόσληψη υπολογίστηκε σε περίπου 24-38 mg/ημέρα [58]. Μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής υπολόγισε 218 mg/ημέρα ολικών φαινολών και ασκορβικού οξέος στη διατροφή του μέσου Αμερικανού [59]. Τα φρούτα είναι πλουσιότερα από τα λαχανικά σε πολυφαινόλες και μπορούν να δώσουν 1-2 g/100g φρέσκων φρούτων (συμπεριλαμβανομένου του φλοιού). Σημαντικές ποσότητες πολυφαινολών μπορεί να παραλάβει ο άνθρωπος και από το τσάι, την μύρα, τον καφέ, και το κόκκινο κρασί. Αυτές υπολογίζονται σε 200-800 mg κατεχίνης/ημέρα. Η βιοδιαθεσιμότητα των μικροσυστατικών των τροφίμων είναι εξαιρετικά σημαντική παράμετρος της διατροφής και σε ότι αφορά τις πολυφαινόλες, παίζει σημαντικό ρόλο για την τελική αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση τους.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πολυφαινολών στο εντερικό περιβάλλον, η απορρόφησή τους από τους εντερικούς ιστούς και τα διαθέσιμα ένζυμα που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό τους παίζουν σημαντικό ρόλο. Ο βιομετασχηματισμός των πολυφαινολικών μικροσυστατικών των τροφίμων σε δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μεγάλης σημασίας για την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση τους [60]. Τα πολυφαινολικά μικροσυστατικά απορροφούνται στα έντερα με παθητική διάχυση. Οι πολυφαινόλες που φέρουν γλυκοζίτη πρέπει πρώτα να υδrolυθούν από γλυκοσιδάσες

και να μετατραπούν σε άγλυκα παράγωγα στον γαστρεντερικό βλεννογόνο ή στη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου. Από ορισμένες μελέτες έχει βρεθεί ότι γλυκοζίτες της κερκετίνης και κυανιδίνης (όπως οι γλυκοζίτες quercetin-4-O-glucoside, και cyaniding-3-glucoside) απορροφούνται αυτούσιοι χωρίς υδρόλυση. Ο βιομετασχηματισμός των πολυφαινόλων στον ανθρώπινο οργανισμό πραγματοποιείται με τις κλασικές μεταβολικές ενζυμικές διεργασίες που γίνονται με τις ξενοβιοτικές ουσίες και τους μεταβολίτες τους. Συνήθως γίνεται σύζευξη με διάφορες ουσίες (όπως για παράδειγμα, το γλυκουρονικό οξύ), που μετατρέπουν τις αρχικές ουσίες σε υδρόφιλες ή ιονισμένες (άρα εύπεπτες) ή διευκολύνουν την απέκκρισή τους.

Οι βασικές μεταβολικές διεργασίες προχωρούν συνήθως μέσω γλυκουρονίδωσης (σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ), σουλφόνωσης (sulfation) και μεθυλίωσης στο λεπτό έντερο, το ήπαρ και άλλα όργανα.

Η γλυκουρονίδωση καταλύεται στα μικροσωμάτια με τα ένζυμα UDP-γλυκουρονυλοτρανσφεράσες (UGT) με το γλυκουρονικό οξύ ως συμπράγοντα. Η σουλφόνωση καταλύεται στο κυτοσόλιο από σουλφοτρανσφεράσες (SULT) με το σχηματισμό θεικών εστέρων (ROSO_3^-) καθιστώντας τις πολυφαινόλες υδρόφιλες, και έτσι, εύκολο να απορροφηθούν ή να απεκκριθούν στα ούρα.

Η μεθυλίωση πραγματοποιείται με τα ένζυμα μεθυλοτρανσφεράσες, που καταλύουν τη μεταφορά μεθυλίου στην πολυφαινόλη μέσω της S-αδενοσυλομεθειονίνης (S-adenosylmethionine, SAM). Οι πολυφαινόλες έχουν διάφορες θέσεις του μορίου τους όπου συμβαίνουν οι αντιδράσεις αυτές και συνήθως η μία αντίδραση ακολουθεί την άλλη αλλά σε διαφορετική θέση ανάλογα με το υπόστρωμα, το είδος και την επάρκεια των ενζύμων σύζευξης. Επίσης οι βιομετασχηματισμοί των πολυφαινόλων επηρεάζονται από τους συμπράγοντες, τον γενετικό πολυμορφισμό, την ενεργοποίηση ενζύμων, το είδος της διατροφής, την κατάσταση του μεταβολισμού του ατόμου, και τη συνεργική ή συναγωνιστική κατάσταση του υποστρώματος (π.χ. φάρμακα), καθώς και των διαφόρων φάσεων του μεταβολισμού.

1.3.4 Μηχανισμοί αναστολής της καρκινογένεσης από φυτοχημικές ουσίες.

Την τελευταία εικοσαετία έχουν πολλαπλασιαστεί οι επιστημονικές δημοσιεύσεις για μηχανισμούς αναστολής ή πρόληψης της καρκινογένεσης σε βιολογικά συστήματα με την επίδραση συγκεκριμένων φυτοχημικών ουσιών των τροφίμων. Σημαντικός αριθμός ερευνών έχει διεξαχθεί με πολυφαινόλες των τροφίμων σε πειραματόζωα - *in vivo* - αλλά και σε εργαστηριακές καλλιέργειες κυττάρων - *in vitro*. Οι έρευνες έδειξαν ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν την προαγωγή της καρκινογένεσης. Παρόλα αυτά, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους επιδρούν στο κυτταρικό επίπεδο δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Μελέτες *in vitro*, έχουν επεκταθεί με συστηματικό τρόπο στους μοριακούς μηχανισμούς της αντικαρκινογόνου δράσης των φυτοχημικών ουσιών. Μελετήθηκαν συγκεκριμένες πολυφαινόλες και μηχανισμοί με ενδείξεις για ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών δραστικών ενώσεων, ενεργοποίηση ενζύμων αποτοξίνωσης, μείωσης των φλεγμονών, ρύθμισης ογκογονιδίων, ενίσχυσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, παρέμβασης στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση, στην αγγειογένεση, και σε οδούς μεταγωγής σημάτων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση [61].

1.3.4.1 Γενικό πλαίσιο των μηχανισμών αναστολής της καρκινογένεσης από φυτοχημικές ουσίες

Η επιστημονική έρευνα έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στους βιολογικούς μηχανισμούς αντί-καρκινογένεσης από συγκεκριμένες φυτοχημικές ουσίες ή ομάδες ουσιών από φυτικά προϊόντα της διατροφής. Αν και πολλοί από τους μηχανισμούς αυτούς έχουν μελετηθεί εκτενέστατα, οι εξηγήσεις των μηχανισμών κατά της καρκινογένεσης και τα συμπεράσματα είναι ακόμη σε πρώιμο επίπεδο. Οι επιστημονικές έρευνες έχουν γίνει με πειραματόζωα ή με τη χρήση καλλιεργειών κυττάρων και με τη χρήση συγκεκριμένων καρκινογόνων ουσιών που προκαλούν διάφορα είδη κακοήθων νεοπλασιών.

Οι διάφοροι μηχανισμοί καρκινικής αναστολής με φυτοχημικές ουσίες, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις παρακάτω ομάδες:

- Αντιοξειδωτική δράση, εξουδετέρωση δραστικών οξυγονούχων και αζωτούχων οξειδωτικών ουσιών, περιορισμός οξειδωτικών βλαβών στο DNA και άλλα σημαντικά βιομόρια (πρωτεΐνες και λιπίδια μεμβρανών).
- Ενεργοποίηση ενζύμων και ενζυμικών συστημάτων αποτοξίνωσης, ιδιαίτερα τις φάσης I και II (induction of detoxification enzymes).
- Αντιφλεγμονώδης δράση φυτοχημικών ουσιών, και η συσχέτισή τους με τις κακοήθεις νεοπλασίες (inflammation inhibition).
- Παρέμβαση σε παράγοντες μεταγραφής (όπως ο NF-kB) (transcription factors).
- Παρέμβαση στον κυτταρικό κύκλο και ενεργοποίηση της απόπτωσης (cell cycle and induction of apoptosis).
- Παρέμβαση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό - αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κακοήθων όγκων (antiproliferation).
- Φυτοχημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη δράση κυκλοοξυγενασών, ενζύμων που ενεργοποιούνται από προαγωγούς νεοπλασματικών όγκων (cyclooxygenase inhibitors).
- Άμεση παρεμπόδιση της μίτωσης μέσω της οδού μεταγραφής Wnt και β-κατενίνης (direct inhibition of mitosis).
- Οιστρογόνος και αντι-οιστρογόνος δραστηριότητα φυτοχημικών ουσιών σε μηχανισμούς καρκινογένεσης (estrogenic and antiestrogenic activity).

1.3.4.2 *Αντιοξειδωτική δράση φυτοχημικών ουσιών και αντικαρκινική δράση*

Η αντιοξειδωτική δράση το φυτοχημικών ουσιών και η ικανότητα εξουδετέρωσης δραστικών ελευθέρων ριζών, οξυγονούχων και αζωτούχων οξειδωτικών

ουσιών (reactive oxygen and nitrogen species, ROS, RNS) οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, θεωρούνται παράγοντες σημαντικής αντικαρκινικής δράσης.

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες και διάφορες οξυγονούχες και αζωτούχες δραστικές ουσίες (όπως το H_2O_2 , το $HOCl$, το $NO\cdot$, το NO_2 , το $O_2^{\cdot-}$ κ.λπ.) παίζουν σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Αλλά σε πολλές περιπτώσεις παραγωγής ROS και εξωγενών παραγόντων (κάπνισμα, τοξικές και καρκινογόνες ουσίες στο εργασιακό περιβάλλον) παρατηρούνται φαινόμενα οξειδωτικού στρες που δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με τους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς εσωτερικούς μηχανισμούς, και μέσω των οξειδωτικών βλαβών δημιουργούνται συνθήκες έναρξης καρκινογόνων μηχανισμών.

Οι οξειδωτικές βλάβες του κυτταρικού και μιτοχονδριακού DNA, θεωρούνται σημαντικά στάδια της έναρξης της καρκινογένεσης ιδιαίτερα όταν προκαλούν συσσώρευση μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα σωματικά κύτταρα ή όργανα του ανθρώπινου σώματος. Η πλειοψηφία των ερευνών για τη συσχέτιση χρόνιων ασθενειών και διατροφής πλούσιας σε αντιοξειδωτικές ουσίες (πολυφαινόλες, φλαβονοειδή, καροτενοειδή, βιταμίνες, κ.λπ.) δείχνουν μείωση του κινδύνου για κακοήγη νεοπλάσματα αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις η υπόθεση της αντιοξειδωτικής συσχέτισης (antioxidant hypothesis) δεν ήταν θετική για ορισμένες νεοπλασίες [62] [63].

Αν και η πλειοψηφία των ερευνών για τις βλάβες στο DNA έχει εντοπιστεί στις οξειδώσεις των νουκλεοβάσεων, ιδιαίτερα στη γουανίνη, υπάρχουν και άλλα είδη βλαβών που οδηγούν μέσω των μεταλλάξεων σε καρκινικές καταστάσεις. Ο πιο σημαντικός βιοδείκτης βλαβών είναι το πρόσθετο με ρίζα υδροξυλίου, 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανোসίνη (8-OH-dG) ή και της οξειδωμένης μορφής 8-οξο-7,8-διϋδρο-2'-δεοξυγουανোসίνη (8-oxo-dG) που είναι η κλασική βλάβη των νουκλεϊκών οξέων, αν και οι άλλες βάσεις του DNA υπόκεινται σε παρόμοια βλάβη σε μικρότερο βαθμό. Η οξειδωτική αυτή βλάβη (8-oxo-dG) έχει καθιερωθεί για ποσοτικό προσδιορισμό (με HPLC) και θεωρείται μετάλλαξη με καρκινογόνο δυναμικό και ενδεικτική για μελλοντική ανάπτυξη κακοηθών νεοπλασιών.

Οι αντιοξειδωτικές φυτοχημικές ενώσεις της διατροφής προκαλούν αναστολή της οξειδωτικής βλάβης στο κυτταρικό DNA και από την άποψη αυτή θεωρούνται ότι συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου για την ανάπτυξη κακοηθών νεοπλασιών. Στον τομέα αυτό, έχουν διεξαχθεί πολυάριθμες έρευνες με φρούτα, λαχανικά, εκχυλίσματα

φυτικών τροφίμων, και στη πλειοψηφία των αποτελεσμάτων παρατηρούνται μειώσεις των οξειδωτικών βλαβών στο DNA [64].

Η λιπιδική υπεροξείδωση (lipid peroxidation) των κυτταρικών μεμβρανών, έχει αναγνωριστεί ως ένας από τους μηχανισμούς καρκινογένεσης και εμφάνισης άλλων παθολογικών καταστάσεων σε αερόβιους οργανισμούς. Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι μια διαδικασία που προκαλείται από δραστικές οξειδωτικές ενώσεις σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, και κατά την έλλειψη αντιοξειδωτικών ενζύμων ή αντιοξειδωτικών ουσιών στα κυτταρικά διαμερίσματα. Τα λιπιδικά υπεροξείδια υφίστανται διασπάσεις δεσμών με σχηματισμό ελευθέρων ριζών και αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν σε αλδεϋδες και άλλες καρβονυλικές ενώσεις. Η λιπιδική υπεροξείδωση αδρανοποιεί μεμβρανικές λειτουργίες, μειώνει την ενζυμική ενεργότητα και παράγει καρκινογόνες ουσίες. Διατροφή πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, μπορεί να μειώνει τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξείδωσης και παράλληλα τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις, και ιδιαίτερα την αθηροσκλήρυνση και τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών στις αρτηρίες. [65].

Η οξείδωση των πρωτεϊνών και γενικά των ενζύμων και των ενζυμικών συστημάτων από οξειδωτικές ουσίες και ROS, θεωρείται σημαντικός παράγοντας παθοφυσιολογίας και δυσλειτουργίες ενζύμων που παίζουν ρόλο αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων. Το οξειδωτικό stress, μέσω των οξειδωμένων πρωτεϊνών, θεωρείται ένας από τους παράγοντες προαγωγής της καρκινογένεσης. Η διατροφή με φυτικά προϊόντα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, έχει θετική επίπτωση στη μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών, και στην καλή λειτουργία των ενζύμων [66].

1.3.4.3 *Μεταβολισμός καρκινογόνων ουσιών*

Η αντικαρκινική δράση των φυτοχημικών ουσιών, περιλαμβάνει την παρεμπόδιση καρκινογόνων και γονοτοξικών ουσιών να αντιδράσουν με το DNA, είτε με την αναστολή της ενεργοποίησης τους σε προ-καρκινογόνα, είτε με ενίσχυση της ενζυμικής αδρανοποίησης και απέκκρισης τους. Οι δράσεις αυτές επιτυγχάνονται με ενεργοποίηση των μεταβολικών ενζύμων της φάσης-I και φάσης-II στο ήπαρ και το έντερο, που οδηγούν τελικά στη σύζευξη των καρκινογόνων και απέκκρισης τους μέσω υδατοδιαλυτών παραγωγών. Η Φάση I, όπως είναι γνωστό, περιλαμβάνει οξειδώσεις,

αναγωγές, και υδρόλυση ξеноβιοτικών ουσιών (όπως φαρμάκων, τοξινών, και καρκινογόνων) και επιτυγχάνεται μέσω των ενζύμων του κυτοχρώματος P450.

Τα προϊόντα μεταβολισμού της Φάσης I, είναι συνήθως δραστικά γονοτοξικά ενδιάμεσα τα οποία σχηματίζουν υποστρώματα για τα ένζυμα της φάσης αυτής, όπως της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης (GST), νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο: αναγωγή κινόνης (NAD: quinone reductase), της συνθετάσης της γ-γλουτάμυλοκυστεΐνης (γ-glutamylcysteine synthetase), τα οποία καταλύουν τον σχηματισμό υδατοδιαλυτών, και λιγότερο δραστικών παραγωγών. Μερικές αντικαρκινικές φυτοχημικές ουσίες επάγουν και ενεργοποιούν την παραγωγή ενζύμων της Φάσης I και II μέσω της αντιοξειδωτικής τους αντίδρασης.

Ορισμένες φυτοχημικές ουσίες, είναι ισχυροί ενεργοποιητές των ενζύμων της Φάσης II (όπως γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση, NAD: αναγωγή της κινόνης, συνθετάση της γ-γλουτάμυλοκυστεΐνης). Τέτοιες ουσίες είναι ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης (epogallocatechin gallate), που είναι βιολογικά ενεργό συστατικό στο τσάι, και προϊόντα διάσπασης γλυκοσινολικών εστέρων (glucocinolates) των σταυρανθών λαχανικών (cruciferous vegetables) όπως τα ραδίκια. Επίσης τα λαχανικά που περιέχουν ισοθειοκυανικές ενώσεις (μπρόκολο) λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο. Τα ένζυμα της Φάσης II με τη σειρά τους, δημιουργούν υδατοδιαλυτά προϊόντα σύζευξης με τις καρκινικές ουσίες, που απεκκρίνονται εύκολα μέσω των νεφρών ή της χολής.

Αρκετά αντιοξειδωτικά φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, η μυριστεΐνη, η απιγενίνη, η επικατεχίνη και άλλες φυτοχημικές ενώσεις, έχουν βρεθεί από έρευνες ότι ενεργοποιούν διάφορα ένζυμα και αναστέλλουν καρκινογόνες διεργασίες σε κυτταρικές καλλιέργειες [67]. Πειράματα έδειξαν πως η κατανάλωση ψυχανθών λαχανικών από καπνιστές, αναστέλλει την παραγωγή μεταβολιτών στα ούρα τους, μιάς από τις πιο δραστικές καρκινογόνες ενώσεις του τσιγάρου, της NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)]. Πιστεύετε ότι η ίνδολο-3-καρβινόλη είναι η υπεύθυνη φυτοχημική ουσία για την ενεργοποίηση μεταβολικών ενζύμων [68].

1.3.4.4 Φλεγμονές και καρκίνος: Αντιφλεγμονώδεις ουσίες μειώνουν τον κίνδυνο για κακοήθεις νεοπλασίες.

Έχει αναγνωρισθεί τα τελευταία χρόνια [69] ότι οι φλεγμονές είναι αιτία αυξημένου κινδύνου για ορισμένα είδη καρκίνων. Οι έρευνες βρήκαν ότι ο σχηματισμός

ελευθέρων ριζών για την καταπολέμηση της λοίμωξης και της φλεγμονής, προκαλούν με τη σειρά τους κυτταρικές βλάβες ιδιαίτερα οξειδωτικές στον DNA, που προάγουν την ανάπτυξη κακοηθών όγκων.

Τις τελευταίες δεκαετίες προστέθηκαν πολυάριθμες έρευνες που συσχέτισαν την αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου, με φλεγμονώδεις κατάστασης του εντέρου. Επίσης, οι χρόνιες φλεγμονές συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο κακοήθων νεοπλασιών και σε άλλα όργανα του ανθρώπινου σώματος, όπως του καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος και της ουροδόχου κύστης. Ο ιός της ηπατίτιδας C, είναι γνωστό ότι αποτελεί πρωτογενή αιτία για καρκίνο του ήπατος. Οι περισσότερες έρευνες συμπεραίνουν ότι τα φαγοκύτταρα κατά την καταπολέμηση της φλεγμονής παράγουν τοξικές οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες και ROS που προάγουν την καρκινογένεση. Ο ρόλος των φαγοκυττάρων στις περιπτώσεις των φλεγμονών έχει εξετασθεί με αρκετές έρευνες και οι οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τη δράση των ROS έχουν τεκμηριωθεί [70]. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και ROS κατά τη διάρκεια των χρόνιων φλεγμονών και της άμυνας του οργανισμού στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων, θεωρείται ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των κακοήθων κυττάρων και μειώνει την απόπτωσή τους.

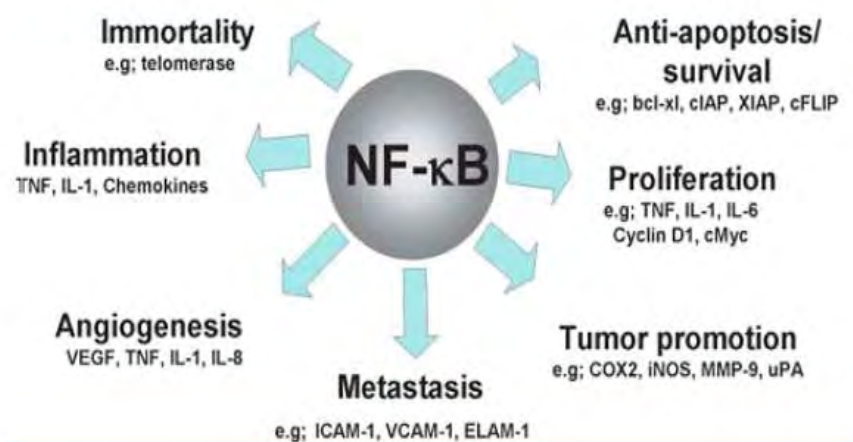
Τέλος, αντιφλεγμονώδεις ουσίες, όπως η ασπιρίνη, και αντιοξειδωτικές ουσίες που μειώνουν τις φλεγμονές, πιστεύεται ότι μειώνουν τον κίνδυνο για κακοήθεις νεοπλασίες.

1.3.4.5 Παρέμβαση σε παράγοντες μεταγραφής και μεταγωγής σημάτων στην καρκινογένεση

Στους μηχανισμούς καρκινογένεσης, συμμετέχουν διάφοροι παράγοντες μεταγραφής και μοριακής μεταγωγής σημάτων. Ένας παράγοντας που έχει διερευνηθεί με αρκετές έρευνες είναι ο NF-κB (nuclear factor kappaB, nuclear factor of kappa light chain gene in b cells) οποίος είναι το συλλογικό όνομα μιας οικογένειας διμερικών πρωτεϊνών που δρουν ως παράγοντας μεταγραφής. Στην αδρανή μορφή του ο NF-κB βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες IκB, ενώ η ενεργοποίηση του NF-κB, περιλαμβάνει φωσφορυλίωση μέσω κινασών. Το στάδιο αυτό απελευθερώνει τον NF-κB που μετακινείται στον πυρήνα όπου δεσμεύεται στην

αλληλουχία kB του DNA, και λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής για τουλάχιστον διακόσια γονίδια που ρυθμίζουν τη φλεγμονή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Ο NF-κB ενεργοποιείται σε πολλούς κακοήθεις όγκους και είναι παράγοντας κλειδί σε φλεγμονές και στα αρχικά στάδια παραγωγής και μετεξέλιξης του καρκίνου [71].

What NF-κB Activates



Εικόνα 8: Μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται ο παράγοντας NF-κB.

Έρευνες έδειξαν ότι αρκετές φυτοχημικές ουσίες όπως η ρεσβερατρόλη, το λεμονένιο, η ινδολο-3-καρβινόλη, η κουρκουμίνη, η γενιστεΐνη, η απιγενίνη κ.λπ. παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του NF-κB στα διάφορα στάδια της ρυθμιστικής του δράσης. Στο ίδιο πλαίσιο, έχει εξεταστεί ο ρόλος διαφόρων φυτοχημικών ουσιών και αντικαρκινικών ουσιών στην ενεργοποίηση/αναστολή διαφόρων παραγόντων μεταγραφής (όπως ο TNF, NF-κB, Nrf2, AP-1) [72] [73]. Σημαντικός αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με τη μοριακή μεταγωγή σημάτων ή μηνυμάτων από διάφορους βιολογικούς παράγοντες στους μηχανισμούς καρκινογένεσης και το ρόλο που παίζουν οι ουσίες της διατροφής στην αναστολή ή παρεμπόδιση των σημάτων αυτών και κατά συνέπεια, στην πρόληψη του κινδύνου καρκινογένεσης.

1.3.4.6 *Παρέμβαση στον κυτταρικό κύκλο και ενεργοποίηση της απόπτωσης.*

Αρκετές έρευνες με φυτοχημικές ουσίες έδειξαν ότι σε διάφορα είδη κυττάρων μπορούν να παρεμποδίσουν τον κυτταρικό κύκλο ή/και να ενεργοποιήσουν την απόπτωσή τους. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, μπορεί να εξαλείψει κύτταρα με βλάβες του DNA και να σταματήσει την ανάπτυξη προκαρκινικών κυττάρων. Η απόπτωση των κυττάρων είναι μέρος του κύκλου των αερόβιων οργανισμών που ανανεώνει και αυξάνει την επιβίωσή τους. Αν και τα μιτοχόνδρια στους αερόβιους οργανισμούς είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της λειτουργίας τους, ξεκινούν τα στάδια της διαδικασίας που οδηγεί στον αποπτωτικό μηχανισμό των κυττάρων, όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης, η θραύση του κυτταρικού DNA, η συρρίκνωση και θραύση των κυττάρων σε μικρά τμήματα που καλούνται αποπτωτικά σώματα (apoptotic bodies). Οι διεργασίες αυτές γίνονται κατά την εμβρυογένεση αλλά και αργότερα σε διάφορα όργανα για να αυξήσουν την επιβίωσή τους από τις εκφυλιστικές δράσεις των οξυγονούχων ελευθέρων ριζών και των ROS.

Έρευνες με διάφορα φλαβονοειδή και ισοφλαβόνες των τροφίμων, έδειξαν ότι η δράση τους ελέγχει η διακόπτει της φάσεις G1/S και G2/M του κυτταρικού κύκλου σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων. Σε πολλές χώρες οι γιατροί προτείνουν τη λήψη συμπληρωματικών αφεψημάτων από βότανα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση για τη μείωση των προκαρκινικών βλαβών στα έντερα ηλικιωμένων, λόγω της αποπτωτικής τους δράσης.

1.3.4.7 *Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από φυτοχημικές ουσίες.*

Η αποδιοργάνωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί ακόμη μια σημαντική βιολογική κατάσταση που ευνοεί την ανάπτυξη και προαγωγή των νεοπλασιών. Αντίθετα, η πρόληψη του καρκίνου συνδέεται άμεσα με την αναστολή, αναστροφή ή καθυστέρηση του υπερ-πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αρκετές έρευνες έδειξαν ότι φυτοχημικές ουσίες με αντιοξειδωτικές ικανότητες επιδρούν αρνητικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές καλλιέργειες κακοήθων ανθρωπίνων κυττάρων. Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή κερκετίνη, ταξιφολίνη, νομπιλετίνη και τανγκερετίνη, σε ποσότητες 2-8μg/mL αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [74]. Παρόμοια αντί πολλαπλασιαστική, αποπτωτική και αντί-

αγγειογενετική δράση σε κυτταρικές καλλιέργειες *in vitro*, έχει βρεθεί και με έρευνες που έχουν γίνει με φλαβονοειδή και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες φρούτων και λαχανικών [75].

1.3.4.8 *Φυτοχημικές ουσίες ως αναστολείς της δράσης των κυκλοοξυγενασών.*

Οι κυκλοοξυγενάσες, είναι βασικά δομικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Η αιμοπεταλική κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1), ονομάζεται και συνθετάση ένα της προσταγλανδίνης-H (PGH). Η COX-1 παράγει την προσταγλαδίνη (PG) που είναι απαραίτητη για τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και ρυθμίζει την ακεραιότητα του γαστρικού βλεννογόνου, ενώ η (επαγόμενη) κυκλοοξυγενάση COX-2, ενεργοποιεί προαγωγούς όγκων και ενδογενείς κυτοκίνες και παράγει προσταγλαδίνες που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις διαδικασίες. Υπάρχει και τρίτο ένζυμο COX-3 (που είναι ποικιλία της COX-1 κυρίως στον εγκέφαλο) αλλά ο φυσιολογικός του ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί [76].

Οι κυκλοοξυγενάσες θεωρούνται ότι μέσω της ενίσχυσης φλεγμονωδών καταστάσεων και παραγωγής ελευθέρων ριζών, καθίστανται παράγοντες ενεργοποίησης νεοπλασματικών όγκων. Οι κυκλοοξυγενάσες COX-1 και COX-2, αναστέλλονται από την ασπιρίνη (ακέτυλοσαλικυλικό οξύ) και άλλα φυσικά παράγωγα του σαλικυλικού οξέος (cyclooxygenase inhibitors). Η δράση τους έχει μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι τα σαλικυλικά παράγωγα ακετυλιώνουν εκλεκτικά το υδροξύλιο ενός αμινοξέος (σερίνη) του ενζύμου, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του παράγοντα NF-kB και αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης IκB [76].

Υπάρχουν σημαντικές πραγματικές ενδείξεις ότι τα φλαβονοειδή είναι αναστολείς του ενζύμου COX-1, και συγκεκριμένα η απιγενίνη, η χρυσίνη, η κεμπφερόλη, η κερκετίνη και αρκετοί αλλά και διάφοροι μεταβολίτες της, παρεμποδίζουν τη μεταγραφή της COX-2 [77]. Ο μηχανισμός αναστολής της δράσης των κυκλοοξυγενασών, χρησιμοποιείται σε διάφορες πειραματικές μελέτες (κουρκουμίνη και παράγωγα της και ορισμένες φυτοστερόλες με αντιφλεγμονώδη δράση) για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου και την απόπτωση κακοήθων κυττάρων [78].

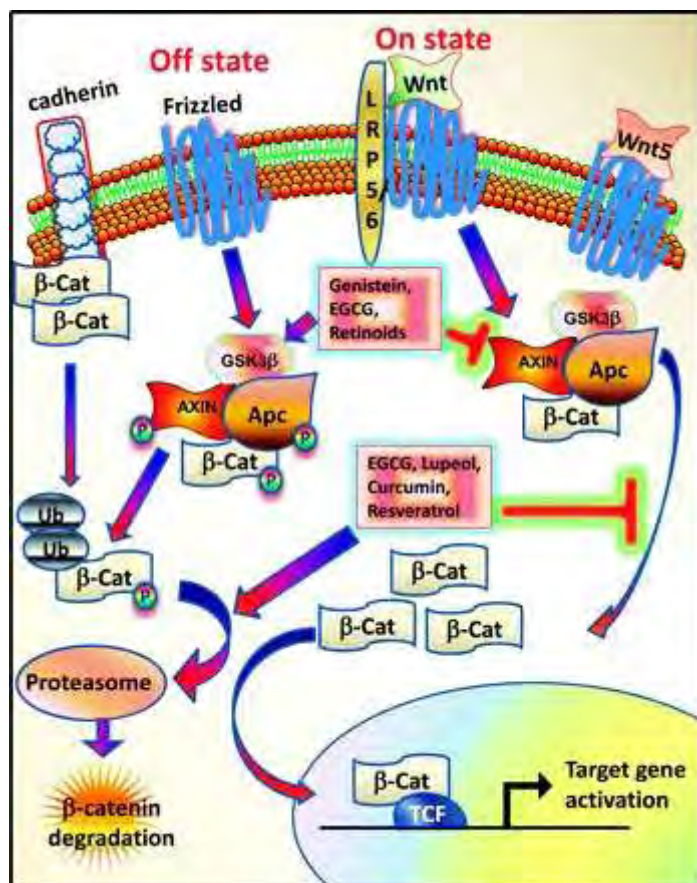
1.3.4.9 Παρεμπόδιση της μίτωσης, μέσω της οδού μεταγωγής σημάτων των πρωτεϊνών WNT από φυτικές ουσίες.

Οι πρωτεΐνες Wnt (ονομασία που προκύπτει από το συνδυασμό γονιδίων Wingless και int) είναι εξωκυτταρικό σύμπλοκο δίκτυο μορίων μετάδοσης μηνυμάτων, που παίζουν ρόλο στην εμβρυογένεση και στα διάφορα είδη καρκίνων καθώς και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της πορείας της β-κατενίνης (β-catenin). Η ενδοκυτταρική πρωτεΐνη β-κατενίνη, ρυθμίζει αρκετές πλευρές της κυτταρικής οργάνωσης, από τη δομή του κυτταρικού σκελετού μέχρι τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θανάτου. Τα επίπεδα της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζονται αυστηρά από ένα πολύπλοκο σύστημα πρωτεοσωμικής διάσπασης .

Η σηματοδότηση μέσω της πορείας των πρωτεϊνών Wnt παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των εντέρων κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών, και στην ομαλή ομοιόσταση στις ώριμες ηλικίες. Δυσλειτουργίες την επαγωγή σημάτων από αυτές τις πρωτεΐνες θεωρείται ότι είναι η κύρια ανωμαλία στην ανάπτυξη του καρκίνου του πεπτικού σωλήνα. Σε φυσιολογικά κύτταρα υπάρχει μεγάλη και σταθερή δεξαμενή ανενεργής β-κατενίνης και μικρή δεξαμενή ενεργής στο κυτταρόπλασμα, αλλά στα καρκινικά κύτταρα η οδός διάσπασης της β-κατενίνης είναι υποβαθμισμένη και η ισορροπία αλλάζει προς όφελος της κυτταροπλασματικής δεξαμενής ενεργής β-κατενίνης. Η ενεργή β-κατενίνη μεταναστεύει στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τον λεμφοειδή παράγοντα των T-κυττάρων (Tcf, T-cell factor), που είναι η οικογένεια παραγόντων μεταγραφής (παράγοντες T-κυττάρων 1, 3, και 4). Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνει τους παράγοντες αυτούς και οδηγεί σε μεταγραφή ποικιλίας τελεστών γονιδίων (όπως C-myc, cyclin-D1, c-jun, COX-2). Οι μηχανισμοί αυτοί μεταγραφής σημάτων και ενεργοποίησης γονιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ενεργές μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-κατενίνης του ανθρώπου, βρέθηκαν σε περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου και μελανώματος και του προστάτη.

Με βάση τη γνώση από τους μηχανισμούς καρκινογένεσης και τη συσχέτιση των Wnt με την πορεία της β-κατενίνης, οι έρευνες στράφηκαν στην άμεση αναστολή της μίτωσης των κυττάρων με φυτοχημικές ενώσεις (direct inhibition of mitosis). Αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ασπιρίνη και η ινδομεθακίνη (indomethacin) είναι γνωστό ότι αναστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που ενεργοποιούνται από τους παράγοντες β-κατενίνη/παράγοντα των T-κυττάρων (Tcf, T-cell factor), σε καρκινικά

κύτταρα του παχέος εντέρου. Πειράματα με φυτοχημικά συστατικά (τον γαλλικό εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης, κουρκουμίνη, γενιστεΐνη, διάφορα είδη τσαγιού κ.α.), έδειξαν αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της οδού μεταγραφής σημάτων της β-κατενίνης [79] [80].



Εικόνα 9: Δράση των φυτοχημικών συστατικών στο μονοπάτι Wnt/β-catenin.

1.3.4.10 Οιστρογόνο και αντιοιστρογόνο δραστηριότητα φυτοχημικών ουσιών.

Η οιστρογονική δράση πολλών ισοφλαβονοειδών ανακαλύφθηκε κατά τη δεκαετία του 1940 και από τότε έχουν γίνει αρκετά πειράματα με πολλές ομάδες φυτοχημικών ουσιών της (ισοφλαβόνες και λιγνάνια) για να πιστοποιηθεί η οιστρογονική ή/και αντί οιστρογονική δραστηριότητά τους. Πολυάριθμα φυτοοιστρογόνα έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα για την πιθανή αντικαρκινική δράση τους.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν διεξαχθεί αρκετά πειράματα για την οιστρογόνο δράση ισοφλαβονοειδών, όπως η γενιστεΐνη, η δαϊδζεΐνη, και η φορμονονετίνη, σε διάφορα πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα έδειξαν οιστρογόνο δράση για πολλά φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή με την γενιστεΐνη να εμφανίζει την μεγαλύτερη δραστικότητα. Από την άποψη των ευεργετικών συνεπειών στην υγεία του ανθρώπου, βρέθηκε ότι η κατανάλωση σόγιας η οποία περιέχει αρκετά υψηλές ποσότητες φυτοοιστρογόνων, συμβάλει στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, στη βελτίωση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και στη μείωση της χοληστερόλης.

Η οιστρογονική δράση των φυτοοιστρογόνων, είναι αρκετά ασθενής σε σχέση με την ισχυρότερη φυσική ορμόνη οιστραδιόλη των θηλαστικών, της τάξης 10^3 - 10^5 φορές ασθενέστερη της 17-β-οιστραδιόλης. Επειδή οι αγλυκόνες των ισοφλαβονών στο αίμα μπορούν να φτάσουν σε συγκεντρώσεις 100 φορές μεγαλύτερες της ενδογενούς οιστραδιόλης, είναι πιθανό να δρουν και ως αντιοιστρογόνα, με την εκλεκτική σύνδεσή τους στους υποδοχείς των οιστρογόνων.

Με βάση την ασθενή οιστρογόνο δράση και την ασθενή ικανότητα να συνδέονται με υποδοχής οιστρογόνων τα ισοφλαβονοειδή (ιδιαίτερα η γενιστεΐνη) και ορισμένα φλαβονοειδή και λιγνάνια, έχουν μελετηθεί για την αντικαρκινική δραστικότητα τους, ιδιαίτερα σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους του μαστού, της ωοθήκης, του ενδομητρίου, και του προστάτη. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακοινωθεί ενδιαφέροντα πειραματικά δεδομένα με φυτοοιστρογόνα για την πρόληψη διαφόρων τύπων καρκίνου [81].

Εν τέλει, συμπεραίνεται, πως οι φυτοχημικές ουσίες της διατροφής μπορούν να εκτελέσουν το ρόλο της χημειοθεραπευτικής πρόληψης και αναστολής της καρκινογένεσης. Πολυάριθμες έρευνες έδειξαν ότι μεγάλος αριθμός φυτοχημικών ουσιών αναστέλλει μηχανισμούς έναρξης και προαγωγής της καρκινογένεσης. Οι φυτοχημικές ουσίες εξουδετερώνουν οξειδωτικές βλάβες σε βιομόρια που γίνονται αιτία έναρξης ή συσσώρευσης προκαρκινικών βλαβών στο DNA. Παρεμβαίνουν στα στάδια καρκινογένεσης είτε με την ενεργοποίηση διαφόρων αδρανοποιητικών ενζύμων, είτε αλλάζοντας την έκφραση γονιδίων, είτε αναστέλλοντας την μεταγωγή σημάτων καρκινογένεσης σε καρκινικά κύτταρα, είτε επαυξάνοντας την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Τέλος η φυτοχημικές ουσίες παίζουν ρόλο στη δράση ογκογονιδίων και σε μηχανισμούς αγγειογένεσης.

1.4 Οικογένεια Rosaceae

Οι ροδίδες (rosaceae) είναι οικογένεια αγγειόσπερμων δικότυλων φυτών της τάξης ροδώδη (rosales). Περιλαμβάνει 1000 περίπου γένη και 3000 περίπου είδη φυτών που έχουν κοσμοπολιτική σχεδόν κατανομή.

Αναλυτικότερα, οι ροδίδες είναι δενδρώδη, θαμνώδη και πολυετή ή (σπάνια) μονοετή ποώδη είδη, με φύλλα απλά ή σύνθετα, κατά κανόνα με παράφυλλα. Τα σπέρματα, ο φλοιός και τα φύλλα περιέχουν άφθονο υδροκυανικό οξύ, καθώς και αμυγδαλίνη, προυλαουρασίνη και προυνασίνη. Το γένωμα των διαφόρων ειδών περιλαμβάνει 7, 8, 9 ή 17 χρωμοσώματα. Τα άνθη είναι συνήθως τέλεια, μερικές φορές χωρίς πέταλα, στις περισσότερες περιπτώσεις περίγυνα, σπάνια υπόγυνα ή επίγυνα. Το περιάνθιο είναι κατά κανόνα πενταμερές, σπάνια τριμερές, τετραμερές ή με περισσότερα τμήματα από πέντε. Ο κάλυκας είναι μερικές φορές διπλός με έναν εξωτερικό κύκλο σέπαλων, που είναι ίσα σε αριθμό με τον κανονικό κάλυκα και διατάσσονται κατ' εναλλαγή με τα σέπαλά του. Οι στήμονες μπορεί να είναι απροσδιόριστου αριθμού ή διπλάσιοι ή πολλαπλάσιοι του αριθμού των σέπαλων και διατάσσονται σε δύο ή περισσότερους σπονδύλους (ή κύκλους). Σε σπάνιες περιπτώσεις είναι ίσοι σε αριθμό με τα σέπαλα ή ένας μόνο. Η ωοθήκη αποτελείται από ένα ή πολλά καρπόφυλλα, τα οποία είναι κατά κανόνα ελεύθερα (απόκαρπη ωοθήκη). Η ωοθήκη είναι μονόχωρη ή (σπάνια) δίχωρη. Περιλαμβάνει μία ή δύο σπερμοβλάστες, σπάνια πολλές. Καρπός αχάινιο, θύλακος ή δρύπη, που μερικές φορές συνδυάζεται με τη διογκωμένη ανθοδόχη για τη δημιουργία σύνθετου καρπού. Το ενδοσπέρμιο περιορισμένο ή απουσιάζει, σπάνια άφθονο. 100 περίπου γένη με 3000 περίπου είδη, με κοσμοπολιτική σχεδόν κατανομή. Αφθονούν ιδιαίτερα στο βόρειο ημισφαίριο και κυρίως στις εύκρατες ζώνες [82].

Τα φυτά της οικογενείας Rosaceae που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Potentilla recta*
- *Sorbus umbellate*
- *Aremonia agrimonoides*
- *Geum urbanum*
- *Potentilla pedata*
- *Alchemilla xanthochlora*
- *Potentilla speciosa*
- *Fragaria vesca*
- *Rubus idaeus*
- *Prunus prostrate*
- *Crataegus orientalis*

1.4.1 *Potentilla recta* (Ποτεντίλλα η Όρθια).



Εικόνα 10: Potentilla Recta

Είναι γηγενές φυτό της Ευρασίας. Ευδοκimeί επίσης και στην κεντρική και νότια Ευρώπη και σε βουνά της βόρειας Αφρικής και της Ασίας. Έχει επίσης εντοπιστεί και σε άλλες χώρες σαν ζιζάνια. Προτιμά τα τραχιά εδάφη με ξηρά έως μέτρια σημεία. Πολυπληθείς πληθυσμοί έχουν επίσης βρεθεί και σε πηλώδη εδάφη. Είναι πολυετές βότανο και ανθίζει μεταξύ Μαΐο και Αύγουστο ενώ, απαντάται σε αγρούς, χωράφια, άγονες εκτάσεις, λιβάδια, βοσκοτόπια, υποβαθμισμένα σημεία, υπερβοσκημένους γρασιδότοπους και σε πλευρές δρόμων. Η ποτεντίλλα συγγέεται με το συγγενές είδος *P. Gracilis* το οποίο όμως είναι πιο κοντό και η κάτω επιφάνεια των φύλλων του επικαλύπτεται με τριχίδια. Η ποτεντίλλα, έχει πολύ καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα. Οι μίσχοι είναι θυσσανώδεις, ανορθωμένοι και με πολλά φύλλα με τριχίδια, που είναι τραχιά αλλά και λεπτοφυή. Τα παράφυλλα της είναι παλαμοειδώς διατεταγμένα και φέρουν πέντε με επτά ενωμένα φυλλάρια. Είναι επίσης πράσινα και έχουν τραχιά τριχίδια και από τις 2 επιφάνειές τους. Τα φύλλα των μίσχων είναι παρόμοια με τα παράφυλλα με τη μόνη διαφορά ότι τα παράφυλλα είναι πιο κοντά, περισσότερα σε αριθμό και εμφανώς εναλλασσόμενα. Τα άνθη έχουν απαλό κίτρινο χρώμα και φέρουν 5 πέταλα διατεταγμένα σε ανοιχτές, επάκριες ταξιανθίες. Η ποτεντίλλα είναι αρχέγονο είδος και μπορεί να βελτιώσει υποβαθμισμένα εδάφη και να αποτρέψει τη διάβρωση. Δεν αποτελεί απειλή για τα άλλα φυτά εκτός και εάν κυριαρχήσει στην περιοχή. Στη σύγχρονη βοτανοθεραπεία, η Ποτεντίλλα θεωρείται ένα από τα καλύτερα στυπτικά βότανα, αποτελεσματικό έναντι των αιμορραγιών και της διάρροιας. Η μεγάλη περιεκτικότητα του βοτάνου σε τανίνες (μέχρι και 20%), είναι εκείνη που φαίνεται να ευθύνεται για την ισχυρή στυπτική του δράση. Η Ποτεντίλλα λέγεται πως είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για τη θεραπεία της γαστρεντερίτιδας και της παρεπόμενης διάρροιας. Όταν η Ποτεντίλλα χρησιμοποιείται για γαργάρες, μπορεί να αντιμετωπίσει τη χαλαρότητα των ούλων ή/και να ανακουφίσει τα "πληγιασμένα" και ερεθισμένα ούλα. Όταν χρησιμοποιείται εξωτερικά, η Ποτεντίλλα περιποιείται πληγές και αμυχές της επιδερμίδας (λέγεται πως παρουσιάζει έντονα επουλωτική δράση), ενώ

όταν χρησιμοποιείται για πλύση είναι κατάλληλη για την αντιμετώπιση της λευκόρροιας και των αιμορροΐδων [83].

1.4.2 *Sorbus umbellata* (Σορβιά η σκιαδιώδης)



Εικόνα 11: Sorbus Umbellate

Ανήκει στο γέννος Sorbus που περιέχει 99 έως 207 είδη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Rosaceae. Είναι φυλλοβόλο, ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι το Μάιο, ενώ το λουλούδι του είναι άσπρο και αστεροειδές. Εντοπίζεται στη Βαλκανική χερσόνησο, στη Ρουμανία, στη Κύπρο, στη Συρία, στο Λίβανο, στο Καύκασο και στο Ιράν. Προτιμά ημισκιώδες περιβάλλον με αρκετή υγρασία χώματος και αντέχει έως τους -23 °C.

1.4.3 *Aremonia agrimonoides* (Αρεμονία η αγριμονιοειδής)



Εικόνα 12: Aremonia Agrimonoides

Είναι το μόνο είδος το οποίο ανήκει στο γένος Aremonia που ανήκει στην οικογένεια Rosaceae. Είναι αειθαλές φυτό, το οποίο φτάνει σε ύψος τα 5 έως 40 εκατοστά. Είναι φυλλοβόλο ανθίζει από τον Μάιο έως τον Ιούνιο και παράγει κίτρινα αστεροειδή λουλούδια. Εντοπίζεται στην κεντρική Ευρώπη, στην ανατολική κεντρική Ευρώπη, στη Ρουμανία, στην Τουρκία και στις Βρετανίδες Νήσοι. Προτιμά ημισκιώδες με σκιώδες περιβάλλον και υγρασία στο έδαφος.

1.4.4 *Geum urbanum* (Γέο ή Γκέο το αστικό)



Εικόνα 13: *Geum Urbanum*

Ανήκει στο γένος *Geum* που περιέχει 26 έως 83 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Rosaceae*. Είναι πολυετές, χνουδωτό φυτό με κίτρινα άνθη με 5 πέταλα, σύνθετα φύλλα και καρπούς καλυμμένους με αγκάθια. Φτάνει σε ύψος τα 20 έως 60 εκατοστά και είναι φυλλοβόλο. Εντοπίζεται σε ολόκληρη την Ευρώπη στην Τουρκία στην Συρία στον

Καύκασο στο βόριο Ιράν και στην δυτική

Σιβηρία. Προτιμά ηλιόλουστο περιβάλλον με μέτρια υγρασία χώματος και μπορεί να αντέξει έως τους -23 °C. Συχνά, χρησιμοποιείται ως βοσκότοποι για μελίσσια. Περιέχει φαινολικούς γλυκοζίτες, ταννίνες και πτητικό έλαιο. Στο μεσαίωνα ο Παράκελσος το συνιστούσε κατά της καταρροής του στομάχου και των εντέρων. Στη σύγχρονη βοτανοθεραπεία το Γέον χρησιμοποιείται από τους θεραπευτές κυρίως για την αντιμετώπιση διαταραχών του πεπτικού συστήματος και για την θεραπεία των αιμορροΐδων. Στη πρώτη περίπτωση το πτητικό έλαιο που περιέχει το Γκέο (ευγενόλη) παρουσιάζει έντονη αντισηπτική και αναλγητική δράση. Η ευγενόλη μέσα στον οργανισμό προωθεί την παραγωγή τρυψίνης (η οποία παράγεται στο πάγκρεας) και η οποία βοηθάει σημαντικά στη πέψη πρωτεϊνών (χρησιμοποιείται για το λόγο αυτό σε βρεφικές τροφές). Συνολικά το Γκέο θεωρείται ότι βοηθάει (κολλίτιδα, στομαχικές διαταραχές και φλεγμονές) και ανακουφίζει (περιπτώσεις διάρροιας) ολόκληρο το πεπτικό σύστημα. Στη δεύτερη περίπτωση, η υψηλή του περιεκτικότητα σε τανίνες (10-20%) χαρίζει στο Γκέο έντονες επουλωτικές και στυπτικές ιδιότητες. Η αιμοστατική του δράση είναι εκείνη που ανακουφίζει τις αιμορροΐδες και τη λευκόρροια καθώς αντιμετωπίζει εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες. Στα συμπληρωματικά οφέλη του βοτάνου πρέπει να σημειωθεί η ομαλοποίηση της λειτουργίας του συκωτιού και της χοληδόχου κύστης, η οποία οφείλεται κυρίως στις πικρές ουσίες που περιέχει το βότανο.

1.4.5 *Potentilla pedata*



Εικόνα 14 Potentilla Pedata

Η *Potentilla pedata*, έχει μορφολογικά χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ *P. hirta* και *P. recta*. Ανήκει στο γένος *Potentilla* και το ύψος του φτάνει τα 15 με 60 cm. Τα άνθη του έχουν ένα πολύ φωτεινό κίτρινο χρώμα και διαθέτει φύλλα που είναι λιγότερο οδοντωτά από εκείνα του *P. recta* και του *P. hirta*.

1.4.6 *Alchemilla xanthochlora* (Αλχεμίλλη)



Εικόνα 15: *Alchemilla*
Xanthochlora

Η *Alchemilla xanthochlora*, είναι θαμνώδες φυτό, και μεγαλώνει σε ζώνες με εύκρατο κλίμα. Βγάζει μικρά πράσινα ή κίτρινα άνθη και χρησιμοποιείται και για διακοσμητικούς σκοπούς. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες του φυτού και από αυτές τρεις είναι οι κυριότερες που φύονται στην Ελλάδα. Οι α) *Arvensis* και β) *Vulgaris* η οποία είναι εξαιρετική τροφή για τα ζώα και γ) *Alpina* η οποία έχει την ιδιότητα να αυξάνει την παραγωγή γάλακτος των ζώων. Η αλχεμίλλη, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της σε τανίνες (16%), έχει ευεργετικές ιδιότητες. Η αλχεμίλλη είναι γνωστή και ως lady's mantle (γυναικείος μανδύας) καθώς κατά το παρελθόν χρησιμοποιούνταν συχνά για τις ευεργετικές της ιδιότητες ενάντια σε διάφορα γυναικολογικά προβλήματα. Έχει ευεργετικές ιδιότητες στην έναρξη της εμμηνορρυσίας, στις διαταραχές της αλλά και στην εμμηνόπαυση. Ανακουφίζει από τους πόνους της εμμηνορρυσίας και περιορίζει την υπερβολική αιμορραγία. Είναι φυτό στυπτικό, διουρητικό, καρδιοτονωτικό, αντιδιαρροϊκό, επουλωτικό σε πληγές, τραύματα, έλκη και επιμολύνσεις, αντιαναιμικό και τονωτικό των μυών. Βοηθάει σε όλες τις γυναικολογικές παθήσεις, σε χαλάρωση των μυών του υπογαστρίου και γενικά σε παθήσεις των μυών, σε πρόπτωση της μήτρας και σε κήλες, σε φλεγμονές της κοιλιακής χώρας και στη λοχεία.

1.4.7 *Potentilla speciosa*

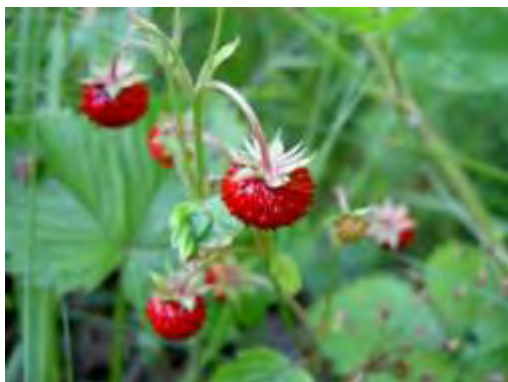


Εικόνα 16: *Potentilla Speciosa*

περιβάλλον με μέτρια υγρασία εδάφους ενώ αντέχει μέχρι τους -23 °C.

Η *Potentilla Speciosa*, ανήκει στο γένος *Potentilla* το οποίο περιλαμβάνει 246 με 686 περίπου είδη. Ανθίζει τον Ιούνιο με Ιούλιο και παράγει άσπρα αστεροειδή λουλούδια. Εντοπίζεται κυρίως στα Βαλκάνια , στην Τουρκία, και στη Συρία. Φτάνει τα 20 με 30 εκατοστά και χρειάζεται ηλιόλουστο

1.4.8 *Fragaria vesca* (Χαμαικέρασος η λεπτή)



Εικόνα 17: *Fragaria Vesca*

Κοινώς ονομάζεται αγριοφράουλα και είναι ένα φυτό των δασικών εκτάσεων που αναπτύσσεται σε όλο το Βόρειο ημισφαίριο του πλανήτη. Ανήκει στο γένος *Potentilla* που περιλαμβάνει 246 με 686 είδη. Φτάνει τα 20 με 30 εκατοστά. Ανθίζει τον Ιούνιο με Ιούλιο και παράγει άσπρα αστεροειδή λουλούδια. Το φυτό αυτό, συναντάται αυτοφυές σε ορεινές, δασώδεις περιοχές. Εντοπίζεται στα Βαλκάνια , στην Τουρκία, στην Συρία και στο Βόρειο Ιράν. Χρειάζεται ηλιόλουστο περιβάλλον με μέτρια υγρασία εδάφους και αντέχει μέχρι τους -23 °C. Οι καρποί του είναι μικρές και πολύ εύγεστες φράουλες. Πρόκειται για χαμηλές, τριχωτές πόες, γνωστές και ως φραουλιές με ρίζωμα που έρπει και σύνθετα φύλλα που αποτελούνται από τρία οδοντωτά φυλλάρια. Φέρουν λευκά μονογενή ή διγενή άνθη διατεταγμένα κατά δέσμες στην κορυφή μακρών ποδίσκων· κάθε άνθος αποτελείται από πεντασχιδή κάλυκα, πέντε πέταλα, 20-35 στήμονες και πολυάριθμους ύπερους. Πρόκειται για το πρώτο είδος φραουλιάς που άρχισε να καλλιεργείται στην Ευρώπη μέχρι τις αρχές του 18ου αιώνα, οπότε αντικαταστάθηκε από το υβρίδιο *Fragaria* × *ananassa*. Αν και χαρακτηριστικό γνώρισμα γενικά της φραουλιάς (κηπευτικής) είναι ότι πολλαπλασιάζεται αγενώς με

παραφυάδες, οι οποίες εκφύονται από τη βάση του βλαστού που αναπτύσσουν επιγενείς ρίζες που δίνουν νέα φυτά, το χαμοκέρασο δεν αναπτύσσει έρπον ρίζωμα (αμολυτές). Αυτό θα καθιστούσε αδύνατη την ανάπτυξή του, καθόσον φύεται σε πετρώδη και σκληρά εδάφη που δεν ευνοούν την ανάπτυξη νέων φυτών. Την βρίσκουμε πάντα σε ξέφωτα των δασών και τις περισσότερες φορές ανάμεσα σε φτέρες, γεγονός που πιστοποιεί την περιορισμένη έκθεσή του στις ακτίνες του ηλίου. Γι' αυτό ποτέ δεν μετατράπηκε σε φράουλα του κήπου (αυτό καθ' εαυτό χωρίς διασταύρωση). Ο καρπός του είναι σύνθετος και ψευδής: αποτελείται από πολυάριθμα, μικροσκοπικά αχάινια - που είναι και οι πραγματικοί καρποί - σφηνωμένα στην κόκκινη, χυμώδη σάρκα της διογκωμένης ανθοδόχης. Αρχικά έχουν λευκοπράσινο χρώμα και κατά την ωρίμανση γίνονται κόκκινες. Τα στοιχεία από τις αρχαιολογικές ανασκαφές δείχνουν ότι η αγριοφράουλα έχει καταναλωθεί από τον άνθρωπο της Παλαιολιθικής εποχής. Τον 17^ο αιώνα εισήχθη στην Ευρώπη το είδος *Fragaria virginiana* της ανατολικής Βόρειας Αμερικής και αργότερα το είδος *Fragaria Chiloensis* της Χιλής, από την διασταύρωση των οποίων προέκυψε τυχαία το υβρίδιο *Fragaria x ananassa*, η λεγόμενη κηπευτική Φράουλα με τους μεγάλους καρπούς. Είναι πλούσιο σε βιταμίνη C και και κάλιο, αλλά και σε μαγνήσιο [84].

1.4.9 *Rubus idaeus* (βάτος η ιδιαί)



Εικόνα 18: *Rubus Idaeus*

Το Σμέουρο (ή νιάουρο), γνωστό και ως Φραμπούαζ (γαλλ. Framboise, αγγλ. Red Raspberry), με επιστημονική ονομασία *Rubus idaeus* (βάτος η ιδιαί), είναι πολυετές άγριο φυτό που παράγει μικρού μεγέθους κόκκινους καρπούς. Έχει απλά πτεροειδή ή σύνθετα παλαμοειδή φύλλα και λευκά ή ρόδινα πενταμερή άνθη. Το γένος *rubus* παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον λόγω των εδώδιμων εύγευστων καρπών του. Το όνομα του είδους *idaeus* (Ιδιαίος - Ζεύς) αναφέρεται στην εμφάνισή του, στο όρος Ίδη κοντά στην Τροία στη βορειοδυτική Τουρκία, όπου οι Αχαιοί το πρωτοαντίκρισαν κατά τον Τρωικό πόλεμο. Είναι πολυετής

φυλλοβόλος αγκαθωτός θάμνος με ύψος που φτάνει το 1,00-1,50μ. και παράγει μικρού μεγέθους κόκκινους καρπούς το καλοκαίρι. Τα φρούτα είναι μια συστάδα drupelets γύρω από έναν κεντρικό πυρήνα και έχουν γλυκιά και λίγο υπόξινη γεύση. Έχει απλά ή σύνθετα παλαμοειδή φύλλα και λευκά ή κόκκινα άνθη την άνοιξη. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστες θέσεις με μέτρια υγρά ή καλά στραγγιζόμενα εδάφη. Τα κατάλληλα εδάφη για την καλλιέργεια είναι τα ελαφρά, με καλή στράγγιση, καλή υγρασία, να είναι πλούσια σε οργανικές ουσίες και ελαφρώς όξινα. Χρήσιμα μέρη του φυτού είναι οι καρποί και τα φύλλα του. Έχει θεραπευτικές ιδιότητες όπως, πρόληψη καρκινωμάτων, ενίσχυση της όρασης, πρόληψη εμφράγματος και δίνει μακροβιότητα. Ο καρπός είναι πλούσιος σε αντιοξειδωτικά και μικροθρεπτικά συστατικά. Σύμφωνα με στοιχεία που μας παρέχει το USDA, το σμέουρο είναι πλούσιο σε κάλιο (151 mg), ασβέστιο (25 mg), μαγνήσιο (22 mg), βιταμίνη C (26,2 mg), βιταμίνη A (33 I.U.) και έχει θεωρητική ενεργειακή απόδοση 52 kcal (μέσες τιμές ανά 100γρ. ωμού φρούτου). Είναι από τα λίγα φρούτα η κατανάλωση του οποίου δεν έχει σημαντική επίδραση στα επίπεδα σακχάρου του αίματος [85] [86].

1.4.10 *Prunus prostrata* (Αγριοκερασιά – mountain cherry)



Εικόνα 19: Prunus Prostrate

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 μέχρι τους -23°C.

1.4.11 *Crataegus orientalis* (Κράταιγος ο ανατολικός)



Εικόνα 20: *Crataegus orientalis*

Ο κράταιγος (*Crataegus*), είναι επίσης γνωστός ως Τρικοκκιά, Μουρζιά, Μπουρμπουτζελιά, Ξανθή Τσαπουρνιά, Τσιατσία και Ξαγκαθιά. Έχει κόκκινους καρπούς (τσιατσία) που χρησιμοποιούνται στην εναλλακτική ιατρική ως

τονωτικά του κυκλοφορικού συστήματος. Είναι θάμνος ή μικρό δέντρο με λοβωτά φύλλα. Ανθίζει το Μάιο και τον Ιούνιο. Ο Κράταιγος ο ανατολικός είναι θάμνος ή δενδρύλλιον με αρτίβλαστα κλαδιά χνουδωρά και διακλαδώσεις απλωτές, σχεδόν αόπλους (χωρίς άκανθες). Έχει φύλλα βραχύμισχα, σφηνοειδή στη βάση, αντωειδή ή προμήκη, πτεροσχιδή. Τα άνθη αυτού είναι διατεταγμένα κατά κόρυμβον πυκνόν, εριώδη.

1.5 Σκοπός του πειράματος.

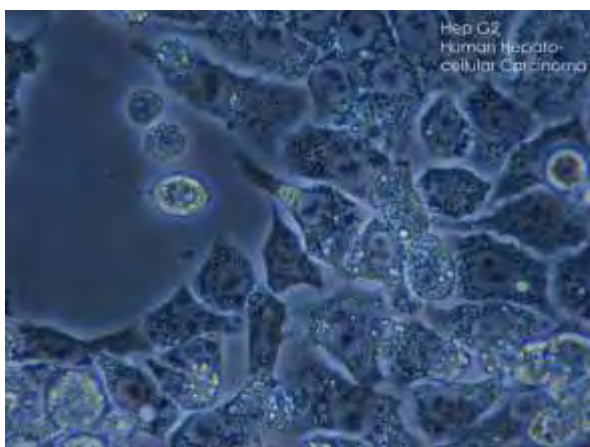
Ο σκοπός της πειραματικής διαδικασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση που έχουν τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας Rosaceae, στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2) *in vitro*, και κατ' επέκταση η αξιολόγηση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων, ως προς την αναστολή της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων που επιτυγχάνουν. Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος XTT, ενώ τα εκχυλίσματα, τα οποία μελετήθηκαν ήταν στο σύνολό τους 11.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

2.1.1 Κυτταρική σειρά



Εικόνα 21: Κύτταρα HepG2

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τους πειραματικούς σκοπούς ήταν η HepG2. Πρόκειται για ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα, που προέρχονται από τον ηπατικό ιστό ενός δεκαπεντάχρονου καυκάσιου αγοριού από τις Η.Π.Α., με ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα είναι επιθηλιακά

σε μορφολογία και έχουν συνήθη χρωμοσωμικό αριθμό 55. Εκκρίνουν μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνών πλάσματος, (λευκωματίνη, τρανσφερίνη, ινωδογόνο, άλφα2-μακροσφαιρίνη, άλφα1-αντιθρυψίνη, πλασμινογόνο), και αποκρίνονται στη διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη. Λόγω του υψηλού βαθμού της μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησης που παρουσιάζουν *in vitro*, τα κύτταρα HepG2, είναι κατάλληλα ως μοντέλο για τη μελέτη του μεταβολισμού του ήπατος, της τοξικότητας διαφόρων ξеноβιοτικών παραγόντων, την ανίχνευση περιβαλλοντικών και διαιτητικών κυτταροτοξικών ή κυτταροπροστατευτικών παραγόντων και για μελέτες στόχευσης φαρμάκων. [87]

2.1.2 Θρεπτικά υλικά και υλικά πειράματος

i. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις καλλιέργειες των κυττάρων αποτελούνταν από:

- Βασικό θρεπτικό μέσο - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- L-γλουταμίνη (Biochrom GmbH)
- Αντιβιοτικά–Αντιμυκητιασικά: Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη/Αμφοτερικίνη-B [10,000 units/mL of penicillin, 10,000 µg/mL of streptomycin, and 25 µg/mL of amphotericin b](Antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)
- Βόειος Εμβρυικός Ορός - FBS fetal bovine serum (Biochrom GmbH)

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά (με και χωρίς FBS) προκειμένου να ικανοποιηθούν οι ανάγκες του πειράματος. Κατά το αρχικό στάδιο του πειράματος στο οποίο γινόταν η εφαρμογή των κυττάρων στο μικροπιάτο ELISA, χρησιμοποιούνταν θρεπτικό υλικό με 10% FBS για να εξασφαλιστεί η ανάπτυξη και η προσκόλληση των κυττάρων στο πιάτο κατά την επώασή τους. Στο αμέσως επόμενο πειραματικό στάδιο, όπου γινότανε η εισαγωγή των εκχυλισμάτων στα κύτταρα καθώς και η μέτρηση με το XTT, χρησιμοποιούνταν θρεπτικό υλικό χωρίς FBS ώστε να μην υπάρξει αλληλεπίδραση με τα προς μελέτη εκχυλίσματα.

a) ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ FBS:

- 250ml DMEM
- 2,5ml L-γλουταμίνη (2mM)
- 2,5ml Antibiotic-antimitotic solution
- 25ml FBS

b) ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΧΩΡΙΣ FBS:

- 250ml DMEM

- 2,5ml L-γλουταμίνη (2mM)
 - 2,5ml Antibiotic-antimitotic solution
- ii. Τρυψίνη 0.25% (Gibco)
 - iii. PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
 - iv. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)
 - v. Πολυφαινολικά εκχυλίσματα των φυτών της οικογένειας Rosaceae. Συγκεκριμένα, μελετηθήκαν εκχυλίσματα των φυτών: *Potentilla recta*, *Sorbus umbellate*, *Aremonia agrimonoides*, *Geum urbanum*, *Potentilla pedata*, *Alchemilla xanthochlora*, *Potentilla speciosa*, *Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Prunus prostrate*, *Crataegus orientalis*.

Στο δεύτερο στάδιο του πειράματος, κατά την μελέτη με την κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

- 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 των φυτών της οικογένειας *Rosaceae*

Κατά την διεξαγωγή του πειράματος, μελετήθηκαν στο σύνολό τους, 11 εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Rosaceae*.

Πίνακας 1: Εκχυλίσματα φυτών της οικογένειας *Rosaceae* που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Δείγμα	Φυτικό εκχύλισμα
1	<i>Potentilla recta</i>
2	<i>Sorbus umbellata</i>
3	<i>Aremonia agrimonoides</i>
4	<i>Geum urbanum</i>
5	<i>Potentilla pedata</i>
6	<i>Alchemilla xanthochlora</i>
7	<i>Potentilla speciosa</i>
8	<i>Fragaria vesca</i>
9	<i>Rubus idaeus</i>
10	<i>Prunus prostrata</i>
11	<i>Crataegus orientalis</i>

2.1.4 Σύσταση Πολυφαινολών των Εκχυλισμάτων

Το εργαστήριο προμηθεύτηκε τα εκχυλίσματα των φυτών, σε στερεή μορφή, από το εργαστήριο του Καθηγητή Σ. Χαρουτουνιάν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο οποίο έγινε και η ανάλυση των πολυφαινολών για το κάθε εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Πολυφαινολική συσταση των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν

Εκχύλισμα	Prunus prostrata	Rubus idaeus	Fragaria vesca	Potentilla speciosa	Alchemilla xanthochloroidea	Potentilla pedata	Geum urbanum	Aremonia agrimonoides	Sorbus umbellata	Potentilla recta	Crataegus orientalis
catechin (mg/g)		23.7	22.1		18.3	28.6		386.1	195.6	26.5	
rutin (mg/g)					98.7	171.9			86.7	128.1	253.0
kaempferol (mg/g)		10.5	12.1		6.1	6.1	2.0	5.1	4.8		
gallic acid (mg/g)		17.6	63.1	40.1	35.7	12.5	11.5	9.4			
gallocatechin (mg/g)			27.9								
chlorogenic acid (mg/g)	0.0	0.0	101.9	45.6	71.4	0.0	0.0	0.0	1723.8	415.7	516.3
caffeic acid (mg/g)	21.8	10.5	6.3	8.3	7.4	5.2	4.4	7.8			7.4
syringic acid (mg/g)	12.2				18.5					1.7	
p-coumaric acid (mg/g)	28.5	2.3	1.1	1.9	14.5	3.0	1.8	7.7			2.2
ferulic acid (mg/g)	53.7	8.9		6.2	11.6			6.3		1.3	
ellagic acid (mg/g)		499.5	1019.4	4127.0	2226.9	312.5	153.5	714.3			
quercetin (mg/g)	90.6	2.9	38.8	15.3	13.4	1.4			6.9	0.8	12.4
trans-cinnamic acid (mg/g)		7.9		5.6	6.1	4.9	4.1	5.8			5.0

2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το πείραμα συνολικά, χωρίζεται σε δύο μέρη:

- I. Κατά το πρώτο μέρος, γίνεται η μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Rosaceae, στα καρκινικά κύτταρα HepG2. Η μελέτη γίνεται με την μέθοδο του XTT, και προσδιορίζεται για κάθε εκχύλισμα η συγκέντρωση στην οποία αυτό επιτυγχάνει την αναστολή της ανάπτυξης του 50% των κυττάρων HepG2, IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration).
- II. Κατά το δεύτερο μέρος της μελέτης, και με την ανάλυση των πολυφαινολών των εκχυλισμάτων που δόθηκε από το εργαστήριο του κυρίου Χαρουτουνιάν, έγινε στατιστική ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (τιμές r) των τιμών IC₅₀ με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα Rosaceae.

2.2.1 *Μελέτη της επίδρασης των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα HepG2 με την μέθοδο του XTT.*

Κάθε πειραματικός κύκλος διαρκούσε δύο εικοσιτετράωρα και αποτελούνταν από τα εξής τρία στάδια:

1. Στρώσιμο των κυττάρων σε Elisa 96-well plate και επώαση τους για εικοσιτέσσερις ώρες.
2. Εφαρμογή των εκχυλισμάτων στα κύτταρα και επώαση τους για εικοσιτέσσερις ώρες.
3. Μέτρηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο του XTT

2.2.1.1 *Καλλιέργεια της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2*

Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η καλλιέργεια των κυττάρων γινόταν σε φλάσκες επιφάνειας 25cm² χρησιμοποιώντας το θρεπτικό υλικό που έχει αναφερθεί παραπάνω (εμπλουτισμένο με 10% FBS). Όταν η επιφάνεια της φλάσκας καλυπτόταν κατά το 70-80%, και πριν τα κύτταρα φτάσουν στην πυκνότητα κορεσμού, γινόταν ανακαλλιέργεια (split). Η αποκόλλησή τους γινόταν επωάζοντάς τα για τέσσερα λεπτά με 330μl τρυψίνης 0,25%. Έπειτα, γινόταν επαναιώριση και το 1/3 των κυττάρων χρησιμοποιούνταν για ανακαλλιέργεια σε καινούρια φλάσκα με 5ml θρεπτικού υλικού (εμπλουτισμένο με 10% FBS).

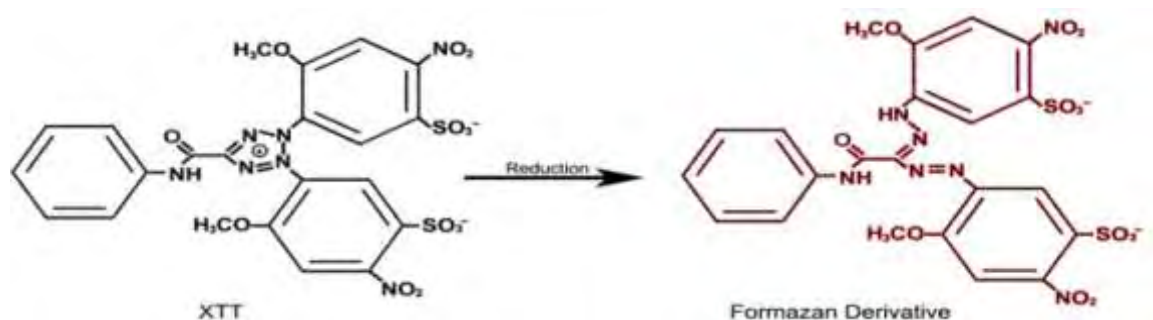
Ο χειρισμός των κυττάρων κατά την πειραματική διαδικασία λάμβανε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood).

Η επώαση των κυττάρων γινόταν σε επωαστικό κλίβανο με παροχή CO₂ 5% και θερμοκρασία T= 37°C.

2.2.1.2 *Μέτρηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων, με τη μέθοδο του XTT.*

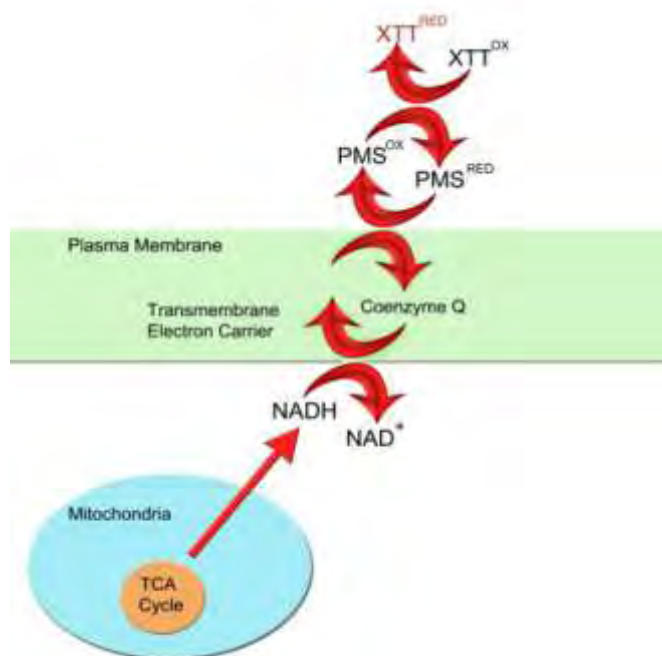
Η δοκιμασία XTT περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1988 από τους Scudiero et al. [88] ως αποτελεσματική μέθοδος για την αξιολόγηση της να κυτταρικής ανάπτυξης

και της ευαισθησίας σε φάρμακα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων.



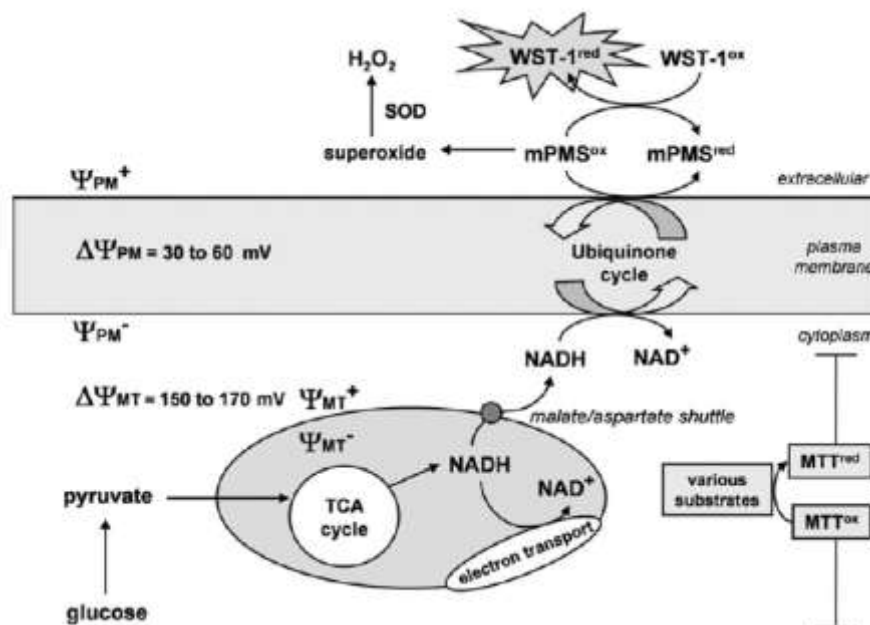
Εικόνα 22: Αναγωγή του XTT στην χρωμοφόρο Φορμαζάνη

Η μέθοδος βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της κυτταρικής ανάπτυξης με χρωματομετρία, μέσω του μεταβολισμού του XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) από τα κύτταρα. Η διαδικασία στηρίζεται στο ότι τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ανάγουν άλατα του τετραζολίου (XTT), μέσω μιτοχονδριακών δεϋδρογονασών, σε χρωματιστά σύμπλοκα φορμαζάνης ενώ στα νεκρά κύτταρα η αντίδραση δεν λαμβάνει χώρα.



Εικόνα 23: Αναγωγή του XTT στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Η αντίδραση, αποτελεί μία προσφορά πρωτονίου στον τετραζολικό δακτύλιο του XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), που έχει ως συνέπεια την διάσπασή του και την δημιουργία των χαρακτηριστικών συζυγιακών δεσμών μεταξύ των ατόμων αζώτου στο υδατοδιαλυτό άλας της φορμαζάνης που δημιουργείται. Το μόριο του XTT περιέχει δυο σουλφονικές ομάδες που του δίνουν συνολικά ένα αρνητικό φορτίο. Αυτό καθιστά δύσκολο για το XTT να περάσει μέσα από την κυτταρική μεμβράνη. Σημαντικά στοιχεία δείχνουν ότι η αναγωγή του XTT συμβαίνει στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ευνοούμενη από την μεταφορά ηλεκτρονίων που συμβαίνει στην επιφάνεια της. Το καθαρό φορτίο του μορίου, και το δυναμικό της μεμβράνης, είναι οι δυο κύριοι παράγοντες που καθορίζουν το αν, και σε τι βαθμό θα λάβει χώρα η αναγωγή. Αναγωγικά μόρια που προκύπτουν στα μιτοχόνδρια (NADH) πιστεύεται ότι μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συμβάλλουν ουσιαστικά στην αναγωγή του XTT. [89]



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού κυτταρικής αναγωγής των τετραζολιακών αλάτων MTT και WST-1(ανάλογο του XTT) [89]

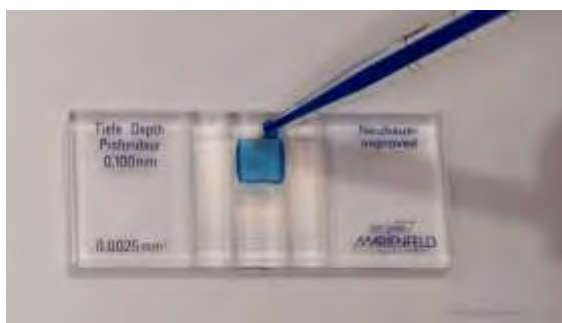
Το XTT μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του ως δείκτης στην αντίδραση ανίχνευσης, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι άριστα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης

XTT βελτιώνονται σημαντικά όταν υπάρχει ένα μόριο που δρα ως ενδιάμεσος αποδέκτης ηλεκτρονίων, όπως το PMS (N-methyl dibenzopyrazine methylsulfate). Το PMS λειτουργεί ως μόριο ενεργοποιητής και συνήθως περιλαμβάνεται στα κιτ προσδιορισμού πολλαπλασιασμού κυττάρων με XTT. Το PMS μεσολαβεί στην αναγωγή του XTT, λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από την κυτταρική επιφάνεια (την οποία προσεγγίζει με μεγαλύτερη ευκολία από το XTT), σχηματίζει ένα δραστικό ενδιάμεσο το οποίο στη συνέχεια ανάγει το XTT στην έγχρωμη φορμαζάνη. [88] [89]

Τέλος, το συζυγιακό σύστημα της φορμαζάνης που προκύπτει, έχει πορτοκαλί χρώμα και εμφανίζει μια απορρόφηση στα 450-475 nm. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα με φασματοφωτομετρία. Μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση στα 450-475nm.

2.2.1.3 Πειραματική διαδικασία.

Στην αρχή κάθε πειραματικού κύκλου, γινόταν αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Το 1/3 των κυττάρων χρησιμοποιούνταν για ανακαλλιέργεια σε καινούρια φλάσκα με 5ml θρεπτικού υλικού (εμπλουτισμένο με 10% FBS). Στα υπόλοιπα κύτταρα, γινόταν μέτρηση με αιμοκυτόμετρο (πλάκα Neubauer), προκειμένου να καθοριστεί ο όγκος στον οποίο περιεχόντουσαν 10.000 κύτταρα.

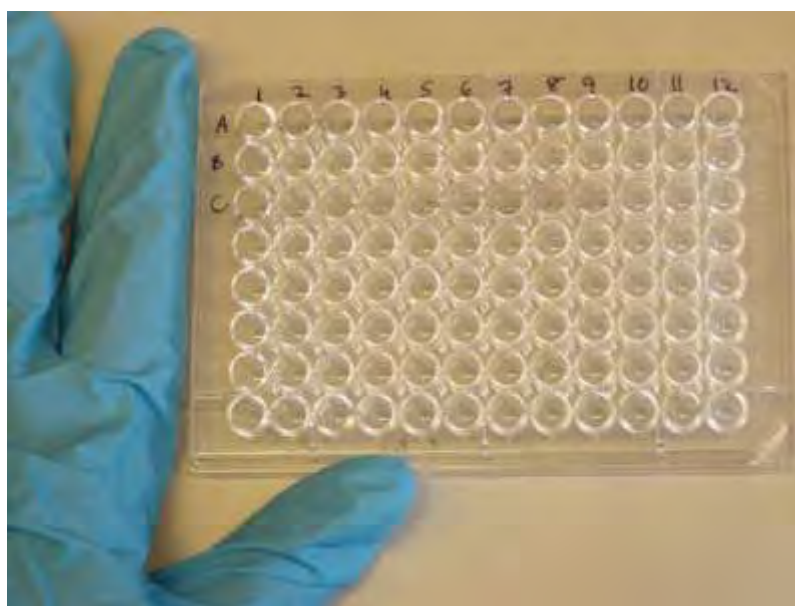


Εικόνα 25: Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer

Στη συνέχεια μεταφερόντουσαν 10.000 κύτταρα σε κάθε θέση ενός μικροτριβλίου ELISA 96 θέσεων (96-well Elisa microplate). Στα κύτταρα προσθέτονταν

θρεπτικό υλικό με 10% FBS και ακολουθούσε εικοσιτετράωρη επώαση στον κλίβανο (37°C , 5% CO_2) προκειμένου αυτά, να προσκολληθούν στο πιάτο.

Μετά το πέρας της επώασης, και αφού αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, ακολουθούσε η πρόσθεση (συνολικού όγκου) 100μl των εκχυλισμάτων *Rosaceae* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, διαλυμένα σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του με τα προς μελέτη εκχυλίσματα). Σε αυτό το στάδιο ακολουθούσε εικοσιτετράωρη επώαση στον κλίβανο (37°C , 5% CO_2).



Εικόνα 26: 96-wel ELISA microplate

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 αντιδραστήριο XTT. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα, θετικοί 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:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_\delta) / A_o \times 100$$

A_o : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 450nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 450nm

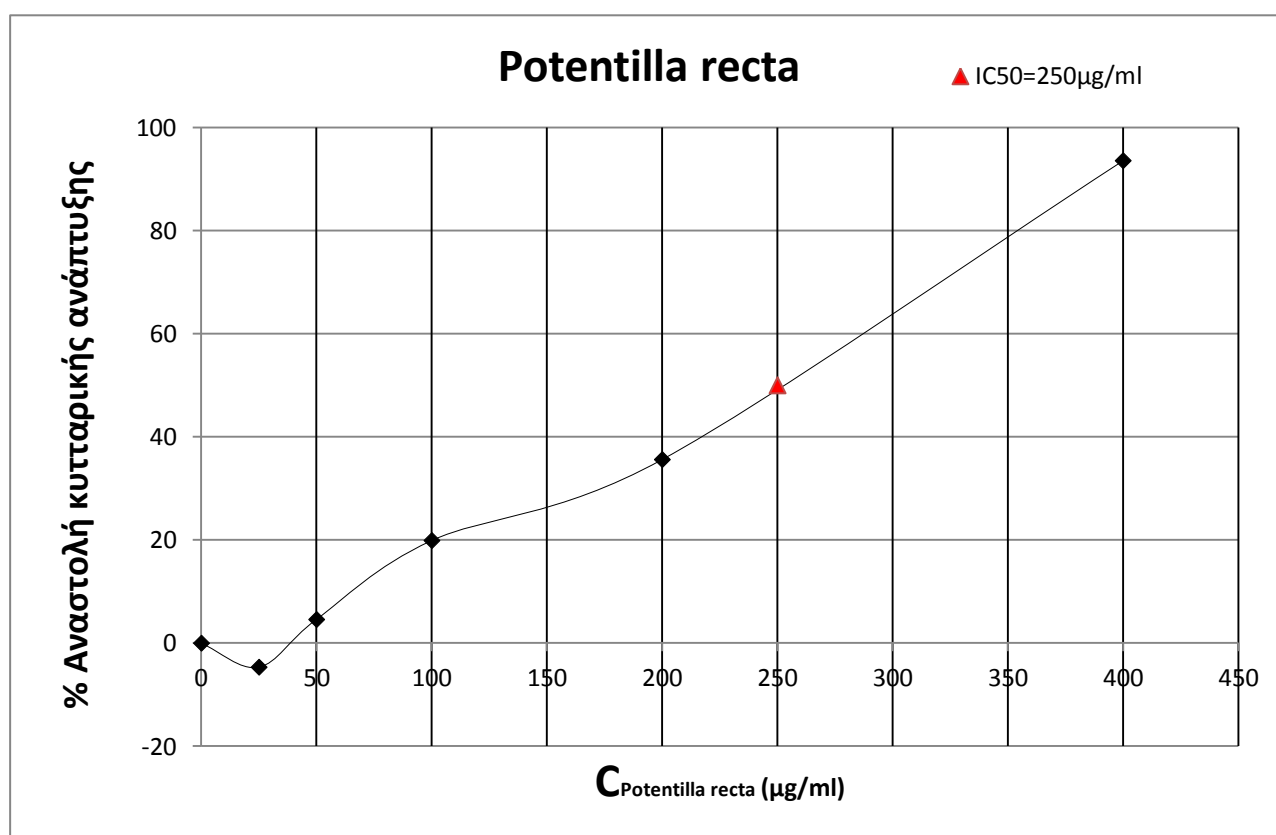
3 Αποτελέσματα

3.1 *Επίδραση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στα κύτταρα HepG2 με την μέθοδο του XTT*

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 10 εκχυλίσματα φυτών της οικογενείας Rosaceae και αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του ήπατος HepG2. Τα εκχυλίσματα ήταν αρχικά σε στερεή μορφή (σκόνη) και διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. 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, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση 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:

3.1.1 Επίδραση του εκχυλίσματος *Potentilla recta*

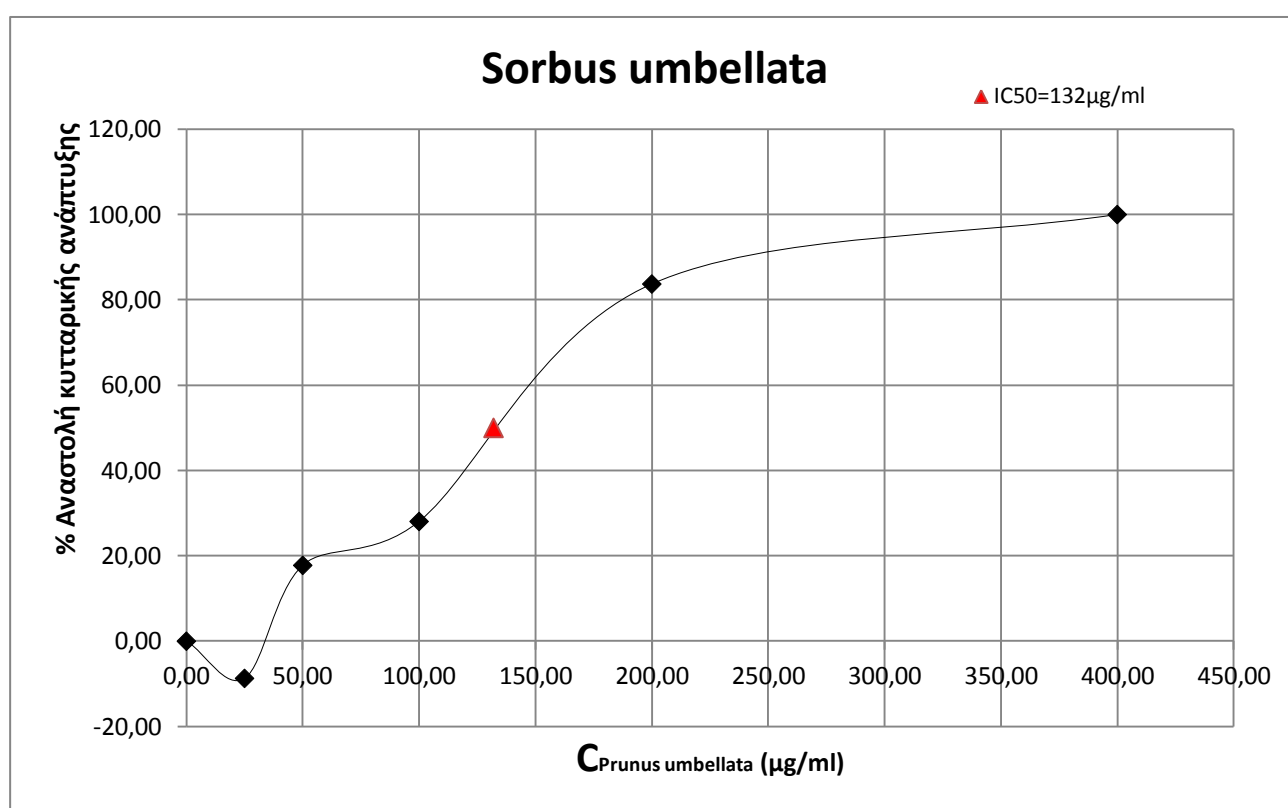
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 25, 50, 100, 200, και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 93%, στα 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 250 $\mu\text{g/mL}$.



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

3.1.2 Επίδραση του εκχυλίσματος *Sorbus umbellata*

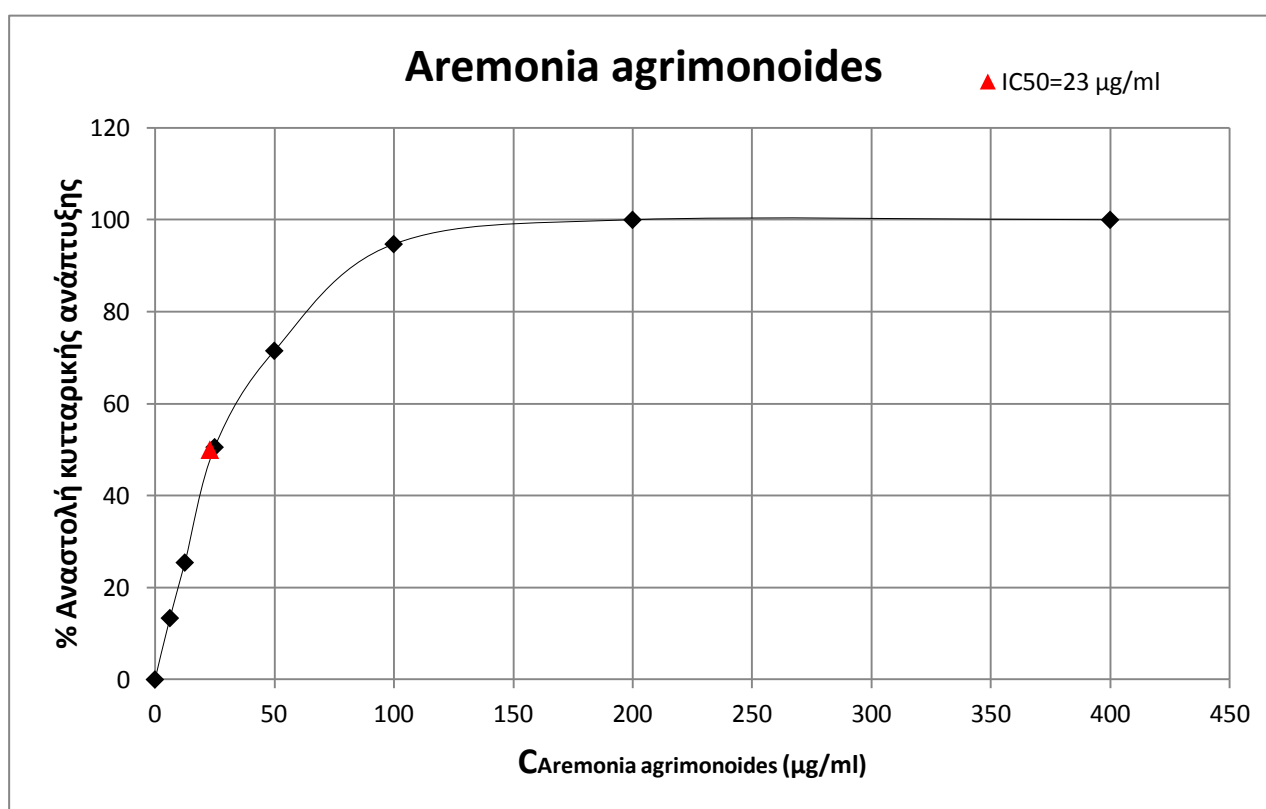
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 25, 50, 100, 200, και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 132 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 2: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Sorbus umbellata*.

3.1.3 Επίδραση του εκχυλίσματος *Aremonia agrimonoides*

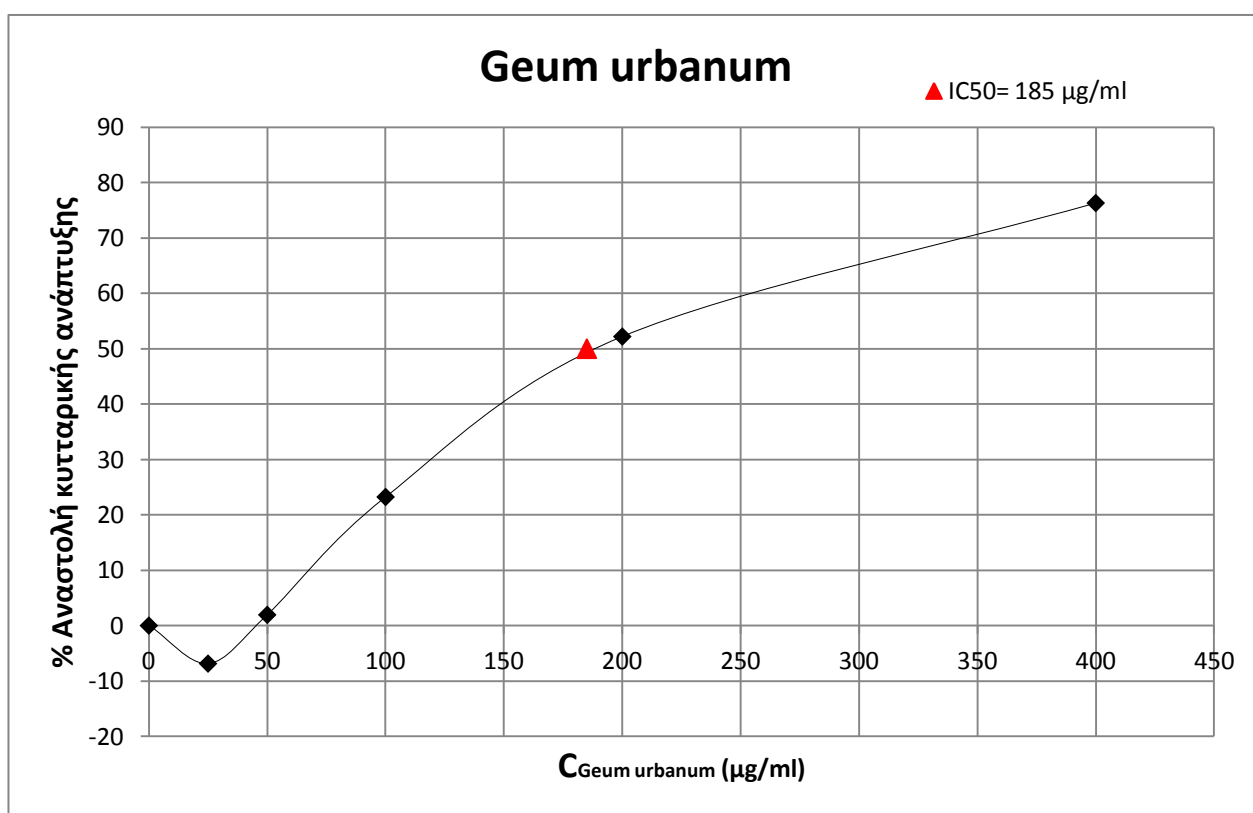
- Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$.
- Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 23 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 3: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Aremonia agrimonoides*.

3.1.4 Επίδραση του εκχυλίσματος *Geum urbanum*

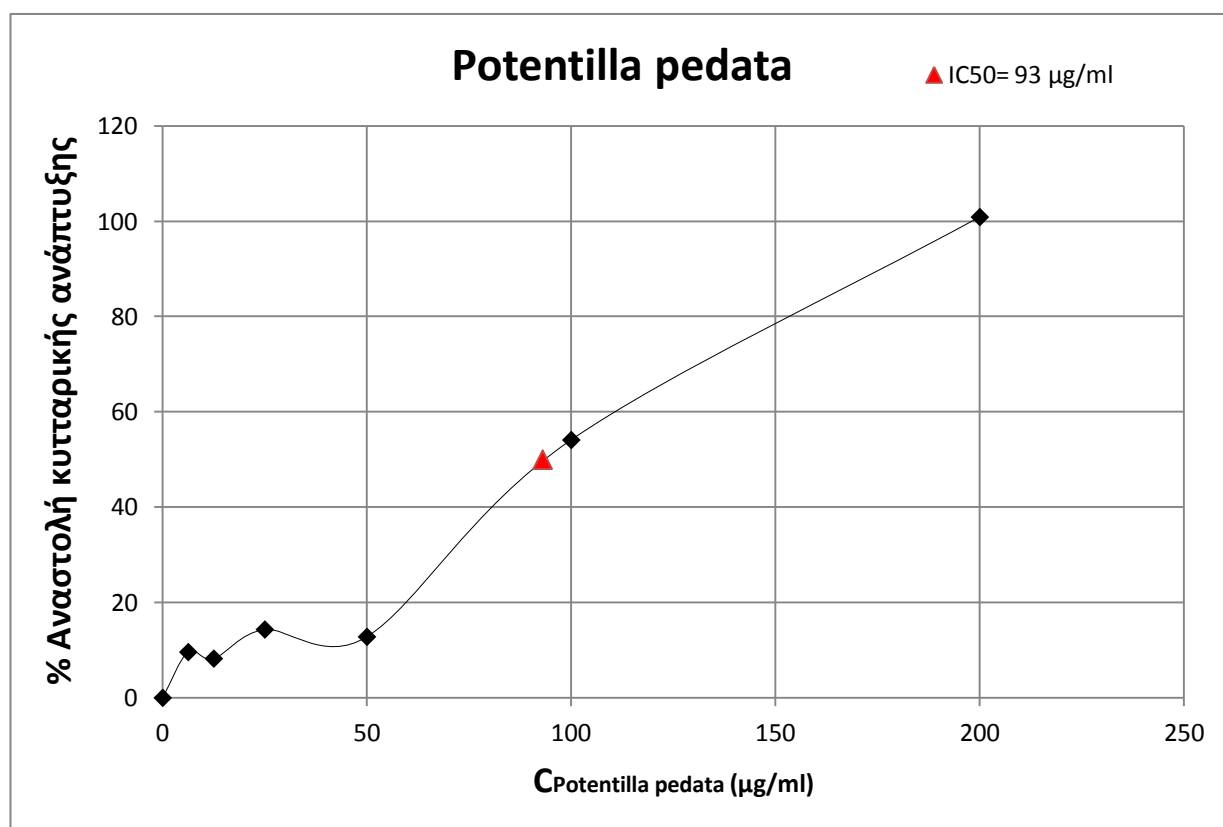
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 25, 50, 100, 200, και 400 $\mu\text{g/ml}$, και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 76%, στη συγκέντρωση 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 185 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 4: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Geum urbanum*.

3.1.5 Επίδραση του εκχυλίσματος *Potentilla pedata*

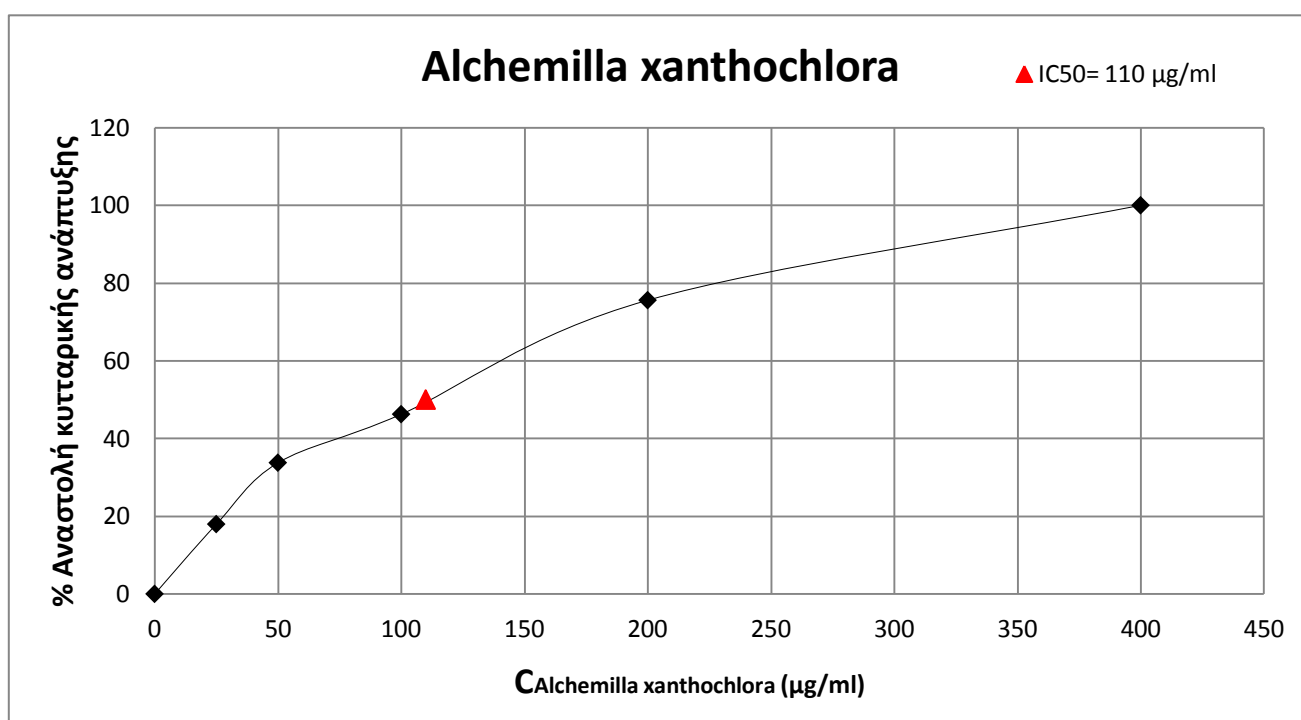
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, και 200 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 93 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 5: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Potentilla pedata*.

3.1.6 Επίδραση του εκχυλίσματος *Alchemilla xanthochlora*

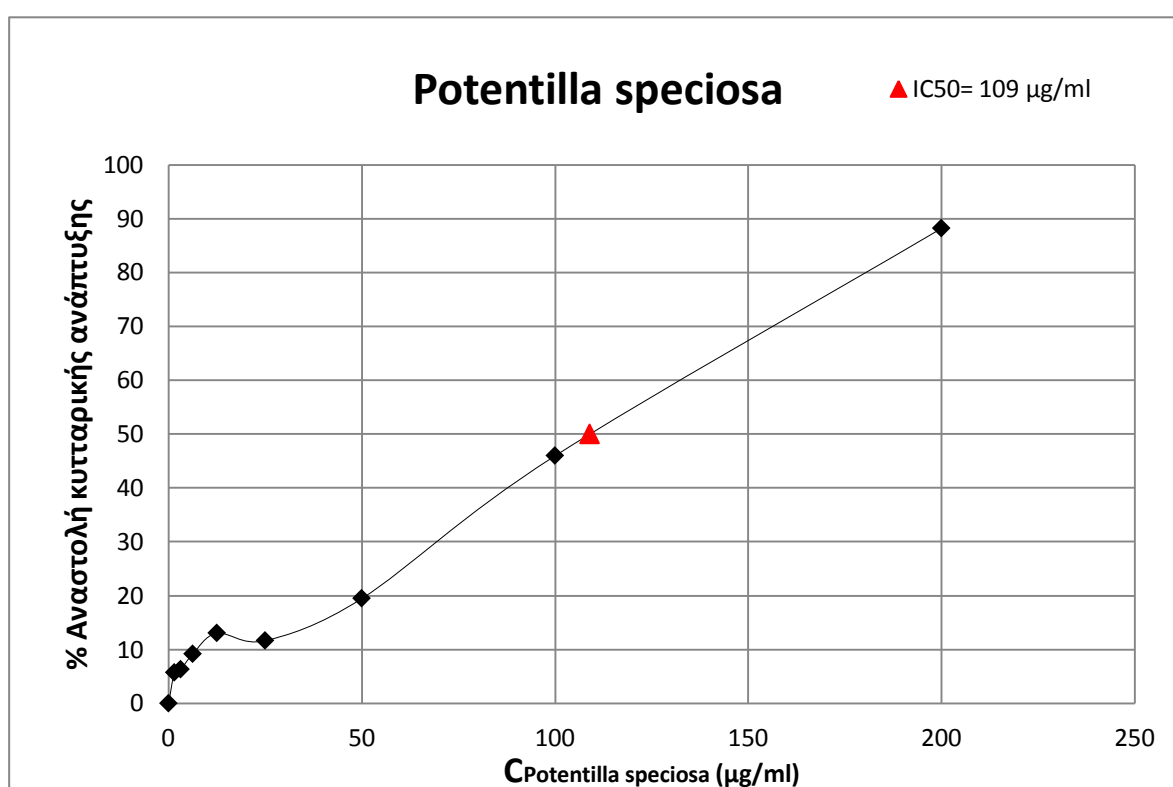
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 110 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 6: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Alchemilla xanthochlora*.

3.1.7 Επίδραση του εκχυλίσματος *Potentilla speciosa*

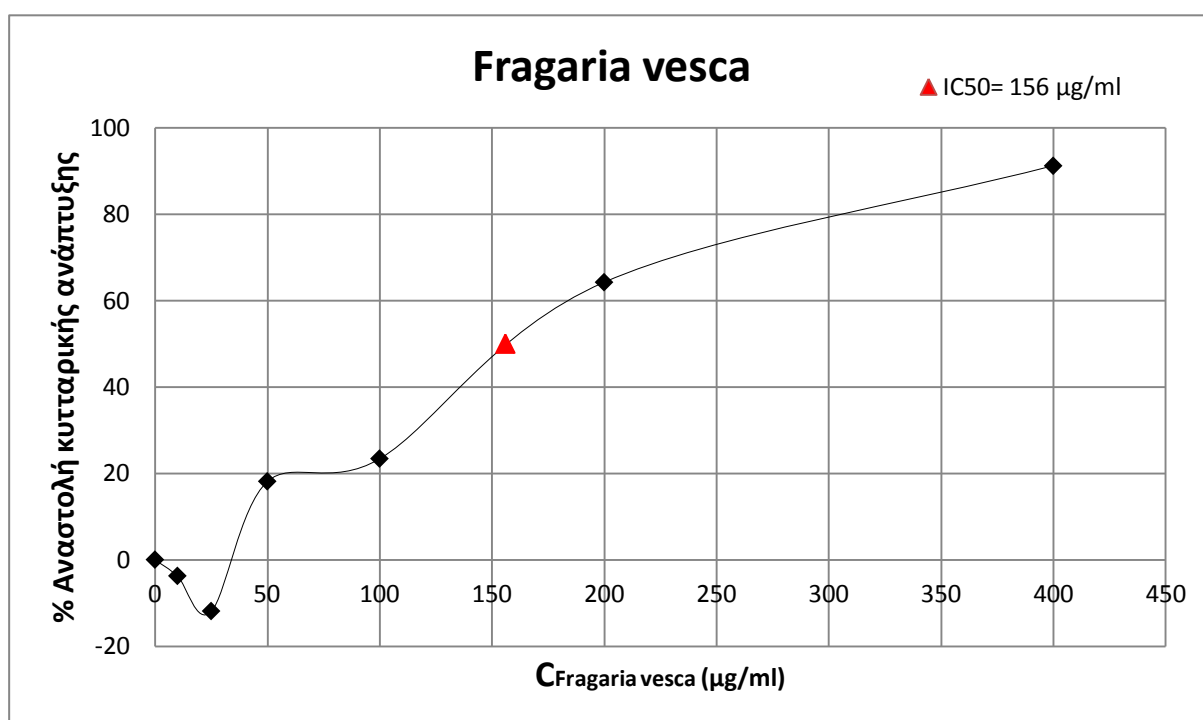
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 88%, στη συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε στα 109 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 7: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Potentilla speciosa*.

3.1.8 Επίδραση του εκχυλίσματος *Fragaria vesca*

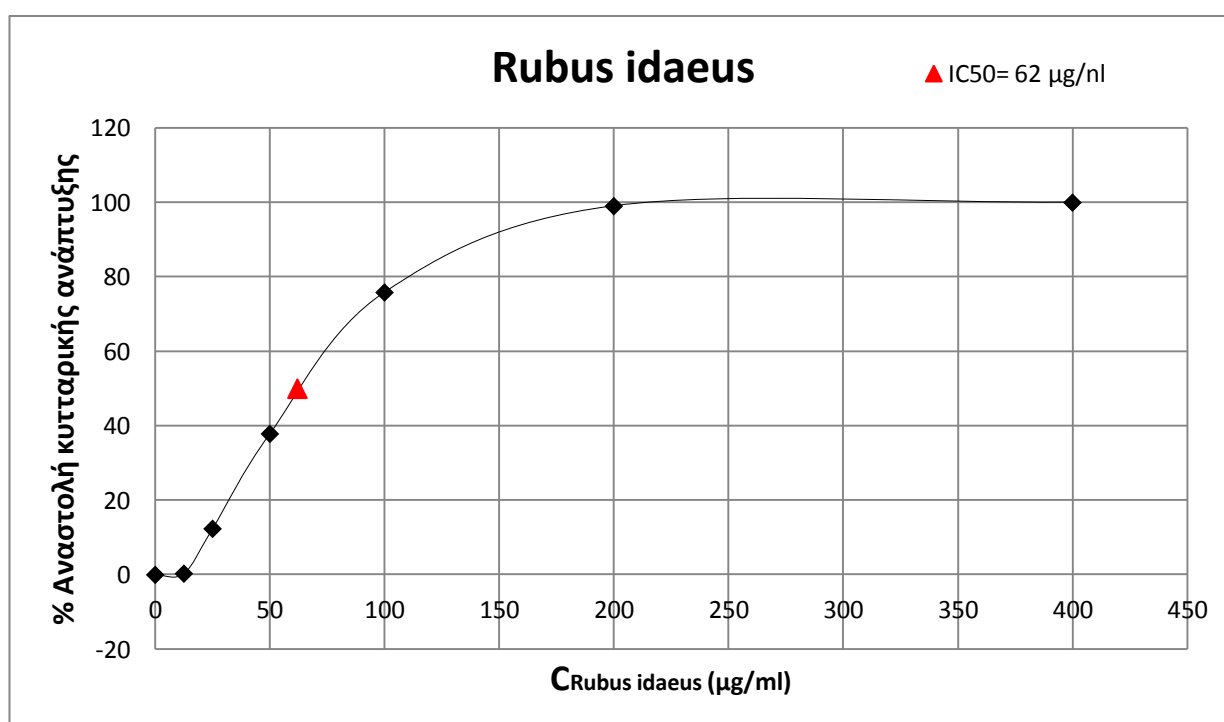
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 10, 25, 50, 100, 200 και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 91%, στη συγκέντρωση 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 156 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 8: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Fragaria vesca*.

3.1.9 Επίδραση του εκχυλίσματος *Rubus idaeus*

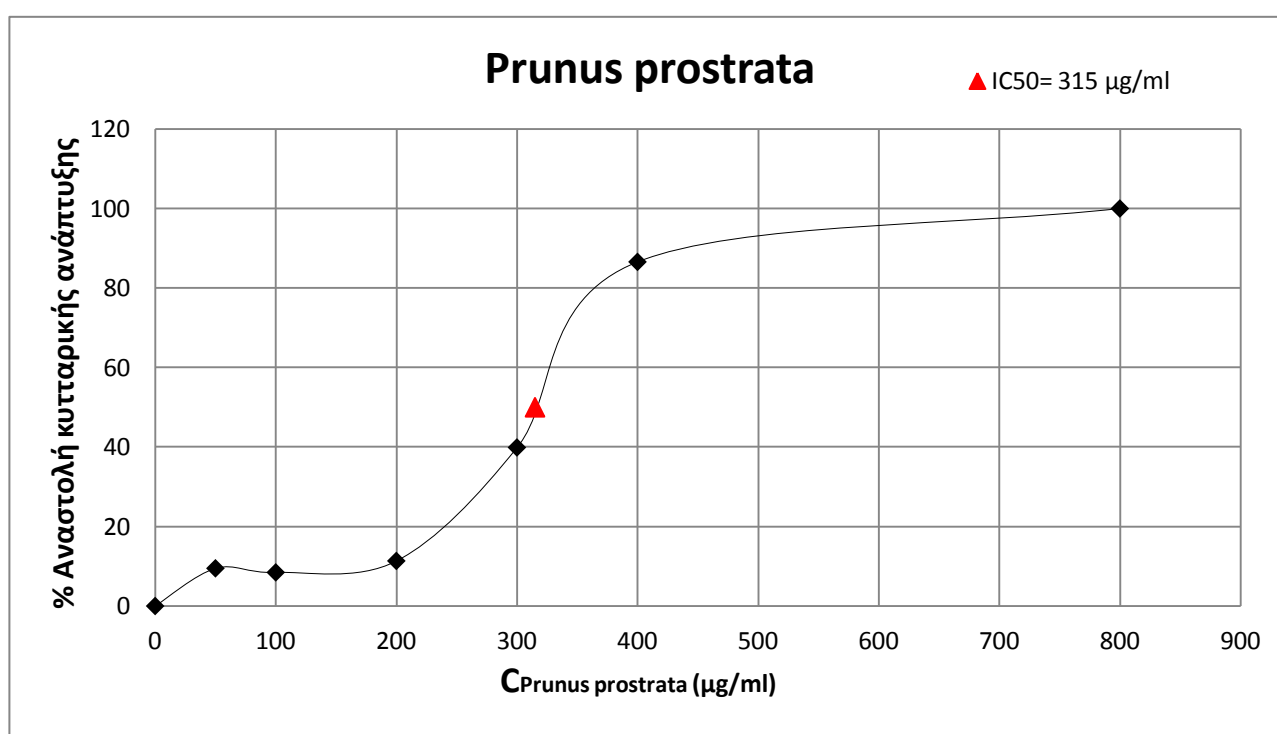
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 και 400 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 400 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 62 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 9: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Rubus idaeus*.

3.1.10 Επίδραση του εκχυλίσματος *Prunus prostrata*

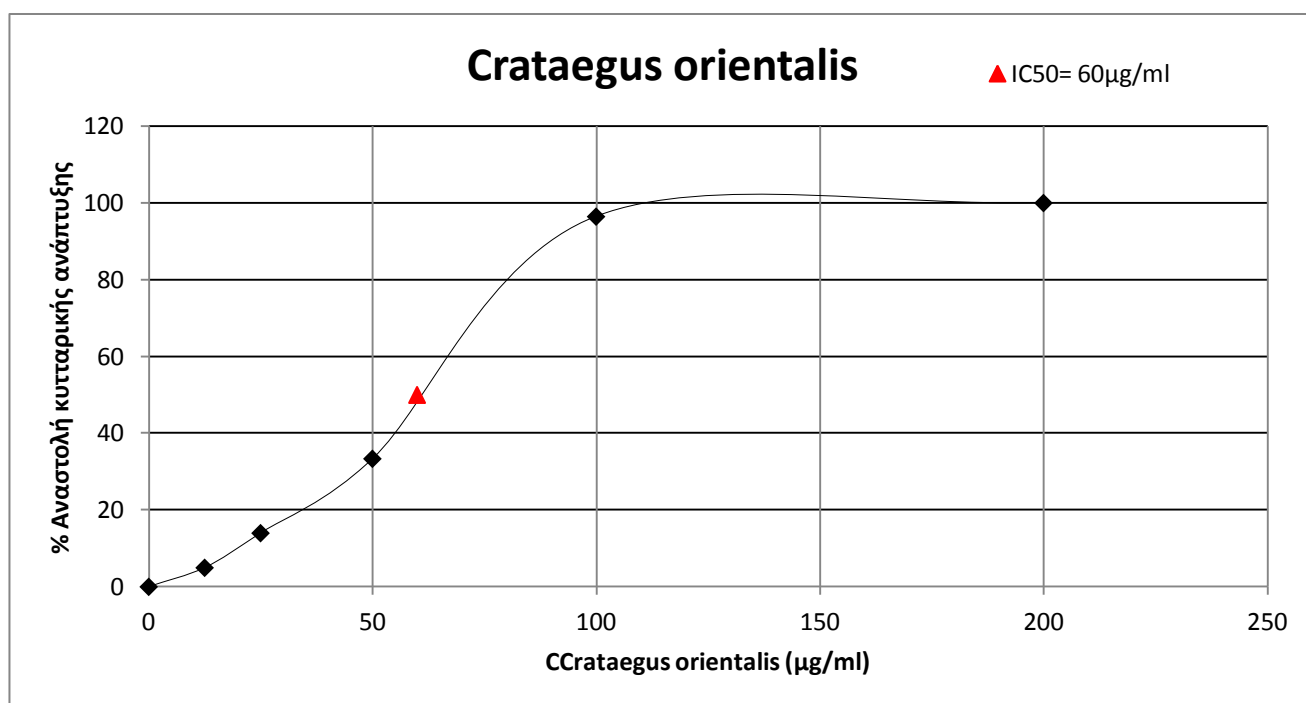
- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 50, 100, 200, 300, 400, και 800 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 800 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 315 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 10: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Prunus prostrata*.

3.1.11 Επίδραση του εκχυλίσματος *Crataegus orientalis*

- i. Εξετάστηκε στις συγκεντρώσεις: 0, 12.5, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$ και έδωσε μέγιστη τιμή αναστολής 100%, στη συγκέντρωση 200 $\mu\text{g/mL}$.
- ii. Η τιμή IC_{50} προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 60 $\mu\text{g/mL}$.

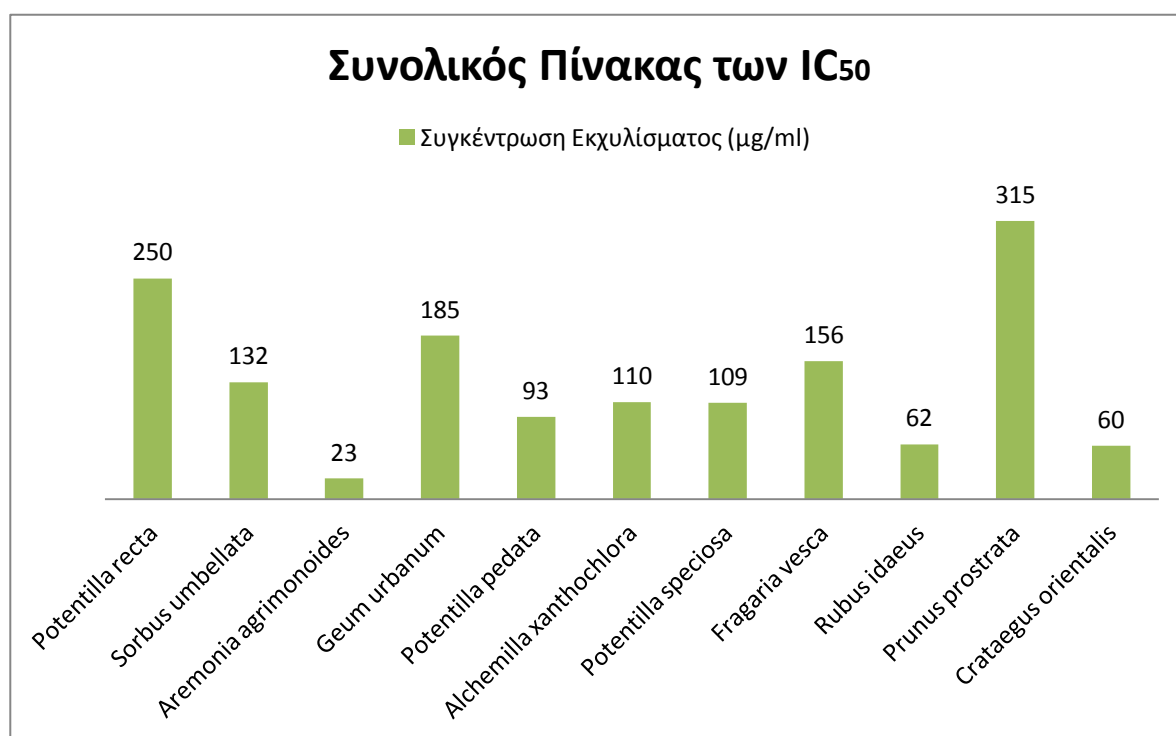


Γράφημα 11: % Αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης των HepG2 κυττάρων προκαλούμενη από το εκχύλισμα του φυτού *Crataegus orientalis*.

3.1.12 Αξιολόγηση αποτελέσματος

Με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και του υπολογισμού των IC₅₀ των εκχυλισμάτων, αξιολογήθηκε η ικανότητα του εκάστοτε εκχυλίσματος να αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. Βρέθηκε πως το εκχύλισμα που πετυχαίνει 50% αναστολή στη μικρότερη συγκέντρωση, είναι το εκχύλισμα αυτό της *Auremonia agrimonoides* με IC₅₀=23μg/ml και δεύτερο αυτό του *Crataegus orientalis* με IC₅₀=60μg/ml.

Παρακάτω δίνεται ο συγκεντρωτικός πίνακας με τα IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν:



Γράφημα 12: Συγκεντρωτικός πίνακας των IC₅₀ των μελετηθέντων εκχυλισμάτων.

3.1.13 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης των τιμών IC_{50} με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα *Rosaceae*.

Στη συνέχεια έγινε στατιστική ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (τιμές r) των τιμών IC_{50} με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα *Rosaceae*. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Στατιστική ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (τιμές r) των τιμών IC_{50} με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα *Rosaceae*.

Πολυφαινόλη	IC_{50}
Catechin	-0,224
Rutin	-0,405
Kaempferol	-0,549
Gallic acid	-0,081
Gallocatechin	0,866
Chlorogenic acid	0,043
Caffeic acid	-0,239
Syringic acid	-0,600
p-coumaric acid	-0,044
Ferulic acid	0
Ellagic acid	-0,139
Quercetin	-0,033
Trans-cinnamic acid	-0,658*

*Στατιστικά σημαντική τιμή ($p < 0,05$).

Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν την μείωση του IC_{50} με την αύξηση της συγκέντρωσης.

Από την ανάλυση της συσχέτισης, προκύπτει ότι για τρεις πολυφαινόλες, *kaempferol*, *syringic acid*, *trans-cinnamic acid*, εμφανίζεται μια μέτρια συσχέτιση (0,5 – 0,7) της μείωσης του IC_{50} με την αύξηση της συγκέντρωσής τους. Ωστόσο, η μόνη

στατιστικά σημαντική τιμή ($p < 0,05$), είναι αυτή του trans-κινάμωμικού οξέος (trans-cinnamic acid).

3.2 Συζήτηση

Ο καρκίνος του ήπατος, είναι ο έκτος πιο συχνός τύπος καρκίνου παγκοσμίως (6%), ενώ αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο (9%). Το 2012 σημειώθηκε σε 782.000 άτομα και το 2015 είχε ως αποτέλεσμα 810.500 θανάτους. Από όλους τους τύπους καρκίνου του ήπατος, ο συχνότερος, που αντιπροσωπεύει το 75% όλων των πρωτοπαθών καρκίνων του ήπατος, είναι το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)

Πρακτικές όπως ο χημειοεμβολισμός, η ενέσιμη χρήση αλκοόλης ή οι ραδιοσυχνότητες μπορεί να είναι χρήσιμες ως παρηγορητικές θεραπείες, παρόλα αυτά επί του παρόντος, δεν υπάρχει κανένα φάρμακο ή συνδυασμός φαρμάκων που να έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπεία για τον καρκίνο του ήπατος. Για τον σκοπό αυτό είναι κρίσιμο, να αναπτύξουμε νέες στρατηγικές αναζήτησης θεραπείας.

Η χημειοπροφύλαξη, η χρήση φυσικών ή συνθετικών χημικών παραγόντων για την αναστροφή, την καταστολή ή την πρόληψη της καρκινογένεσης, αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο αντιμετώπισης του HCC. Οι φυτοχημικές ουσίες της διατροφής μπορούν να εκτελέσουν το ρόλο της χημειοθεραπευτικής πρόληψης και αναστολής της καρκινογένεσης. Πολυάριθμες έρευνες έχουν δείξει, ότι μεγάλος αριθμός φυτοχημικών ουσιών αναστέλλει μηχανισμούς έναρξης και προαγωγής της καρκινογένεσης. Οι φυτοχημικές ουσίες εξουδετερώνουν οξειδωτικές βλάβες σε βιομόρια που γίνονται αιτία έναρξης ή συσσώρευσης προκαρκινικών βλαβών στο DNA. Παρεμβαίνουν στα στάδια καρκινογένεσης είτε με την ενεργοποίηση διαφόρων αδρανοποιητικών ενζύμων, είτε αλλάζοντας την έκφραση γονιδίων, είτε αναστέλλοντας την μεταγωγή σημάτων καρκινογένεσης σε καρκινικά κύτταρα, είτε επαυξάνοντας την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Τέλος η φυτοχημικές ουσίες παίζουν ρόλο στη δράση ογκογονιδίων και σε μηχανισμούς αγγειογένεσης.

Αυτή η εργασία, εστιάζεται στις φυτικές πολυφαινόλες, μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυτοχημικών συστατικών, και τις χημειοπροφυλακτικές τους ιδιότητες εναντίον του HCC. Συγκεκριμένα, ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Rosaceae, στην αύξηση καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2). Ειδικότερα, εξετάστηκε η επίδραση 11 πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από φυτά: *Potentilla recta*, *Sorbus umbellata*, *Aremonia agrimonoides*, *Geum urbanum*,

Potentilla pedata, *Alchemilla xanthochlora*, *Potentilla speciosa*, *Fragaria vesca*, *Rubus idaeus*, *Prunus prostrata*, *Crataegus orientalis*. Για τη μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αναγωγής του XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) από τα κύτταρα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ανασταλτική δράση όλων των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση των HepG2, με τιμές IC_{50} που κυμαίνονταν από 23 έως 315 $\mu\text{g/mL}$, επιβεβαιώνοντας τον χαρακτηρισμό τους σαν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Ταυτόχρονα, όπως παρατηρείται στα Γραφήματα 1 – 11, η αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων HepG2 που εξετάστηκαν εμφανίζεται να είναι κατά βάσει δοσοεξαρτώμενη, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που χορηγούνται στα υπό εξέταση κύτταρα τόσο αυξάνεται και η αναστολή που παρουσιάζεται σε αυτά. Την πιο ισχυρή δράση (μικρότερη τιμή IC_{50}) εμφάνισε το εκχύλισμα της *Aremonia agrimonoides* ($IC_{50}=23\mu\text{g/ml}$), με δεύτερο αυτό του *Crataegus orientalis* ($IC_{50}=60\mu\text{g/ml}$). Την ασθενέστερη δράση, όσον αφορά την αναστολή των κυττάρων HepG2, προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των *Prunus prostrata* και *Potentilla recta* με τιμές $IC_{50}=315\mu\text{g/ml}$ και $IC_{50}=250\mu\text{g/ml}$ αντιστοίχως. Συνολικά, 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 *Aremonia agrimonoides* και ασθενέστερο εκείνα του φυτού *Prunus prostrata*.

Στη συνέχεια του πειράματος, και με δεδομένη την ανάλυση των πολυφαινολών των εκχυλισμάτων, έγινε στατιστική ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (τιμές r) των τιμών IC_{50} με τις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα Rosaceae. Από την ανάλυση προέκυψε, στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) συσχέτιση του κινναμωμικού οξέος (trans-cinnamic acid) με την μείωση του IC_{50} , πράγμα που υποδηλώνει την επίδραση του κινναμωμικού οξέος στην αναστολή των καρκινικών κυττάρων.

Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών που επιβεβαιώνουν την επίδραση του κινναμωμικού οξέος στην αναστολή των καρκινικών κυττάρων και συσχετίζουν την δράση του με αύξηση της απόπτωσης και μείωση του μεταστατικού δυναμικού [90] [91]. Συγκεκριμένα, το κινναμωμικό οξύ βρέθηκε πως αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου, στην κυτταρική σειρά HT29

(colon carcinoma cells) με $IC_{50}=1mM$. Η δράση του, συσχετίστηκε με την αναστολή της δεακετυλάσης των ιστονών (HDAC inhibition), την αύξηση της έκφρασης των Bax και μείωση της έκφρασης των Bcl-2 πρωτεϊνών, πράγμα που δικαιολογεί την αποπτωτική δράση του κιναιμωμικού οξέος. Επίσης, στην κυτταρική σειρά A549 (επιθηλιακά κύτταρα κυψελιδικού καρκίνου του πνεύμονα), έδειξε να αναστέλλει το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων, και συγκεκριμένα, συσχετίστηκε με την μείωση των επιπέδων της έκφρασης μεταλλοπρωτεϊνών (MMP's), των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, πράγμα που αποτελεί το πρώτο βήμα της μεταστατικής διαδικασίας.

Εν τέλει, συμπεραίνεται, πως οι φυτοχημικές ουσίες της διατροφής μπορούν να εκτελέσουν το ρόλο της χημειοθεραπευτικής πρόληψης και αναστολής της καρκινογένεσης. Πολυάριθμες έρευνες έχουν δείξει ότι μεγάλος αριθμός φυτοχημικών ουσιών αναστέλλει μηχανισμούς έναρξης και προαγωγής της καρκινογένεσης. Οι φυτοχημικές ουσίες εξουδετερώνουν οξειδωτικές βλάβες σε βιομόρια που γίνονται αιτία έναρξης ή συσσώρευσης προκαρκινικών βλαβών στο DNA. Παρεμβαίνουν στα στάδια καρκινογένεσης είτε με την ενεργοποίηση διαφόρων αδρανοποιητικών ενζύμων, είτε αλλάζοντας την έκφραση γονιδίων, είτε αναστέλλοντας την μεταγωγή σημάτων καρκινογένεσης σε καρκινικά κύτταρα, είτε επαυξάνοντας την απόπτωση καρκινικών κυττάρων. Τέλος η φυτοχημικές ουσίες παίζουν ρόλο στη δράση ογκογονιδίων και σε μηχανισμούς αγγειογένεσης.

Σήμερα, που μέσω νέων τεχνολογιών καθίσταται δυνατή η ανάλυση των βιοδραστικών συστατικών των τροφών είναι κρίσιμο να συνεχιστούν οι έρευνες στο μοριακό επίπεδο για την πλήρη εξακρίβωση του μηχανισμού αναστολής της κυτταρικής αύξησης των καρκινικών κυττάρων και της επαγωγής της απόπτωσης από συγκεκριμένες πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ιδιαίτερα χρήσιμη θα ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης τους με την ρύθμιση γονιδίων, ενζύμων, έκφρασης ογκογονιδίων, μεταγραφής μηνυμάτων, αγγειογένεσης και άλλων παραγόντων που σχετίζονται με την καρκινογένεση σε μοριακό επίπεδο.

4 Βιβλιογραφία

- [1] Wikipedia, the free encyclopedia, «wikipedia.org,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Edwin_Smith_Papyrus.
- [2] Γ. Μπαμπινιώτης, Λεξικό της Νέας Ελληνικής.
- [3] U.S. National Library of Medicine, «<https://www.nlm.nih.gov/>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.nlm.nih.gov/news/turn_page_egyptian.html.
- [4] S. Mukherjee, Η μεγάλη ασθένεια: Βιογραφία του καρκίνου, Μεταίχμιο, 2013.
- [5] World Health Organization, «<http://www.who.int/>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- [6] World Health Organization, «<http://www.who.int/>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>.
- [7] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts και P. Walter, Essential Cell Biology (second edition), Garland Science/Taylor & Francis Group, 2003.
- [8] R. A. Weinberg, The Biology Of Cancer, 2007, p. 14 (chapter 11).
- [9] B. Vogelstein και K. Kinzler, «The multistep nature of cancer.,» *Trends in Cell Biology*, December 1999.
- [10] M. Dollinger, E. Rosenbaum και G. Cable, Everyone's guide to cancer therapy: how cancer is diagnosed, treated, and managed day-to-day, 1991.
- [11] P. J. Russell, iGenetics. A Mendelian approach, τόμ. 2, 2006, pp. 986-988.
- [12] «American Cancer Society,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/geneticsandcancer/genesandcancer/genes-and-cancer-oncogenes-tumor-suppressor-genes>.
- [13] L. Goldman και J. C. Bennett, Cecil Νοσολογία, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 2003.
- [14] World Health Organization, «www.who.int/,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- [15] B. Armstrong και R. Doll, «Enviromental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices.,» *International Journal of Cancer*, 1975.

- [16] S. Palmer, «Diet, nutrition, and cancer (Review),» *Progress in food & nutrition science Journal Impact Factor & Information*, 1985.
- [17] W. Willet και B. MacMahon, «Diet and cancer: an overview,» *The New England Journal of Medicine*, 1984.
- [18] D. Trichopoulos, «Nutritional epidemiology of human cancer: past and future of epidemiologic research.,» *European Journal of Clinical Nutrition*, 1991.
- [19] G. Block, B. Patterson και A. Subar, «Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence.,» *Nutrition and Cancer*, 1992.
- [20] D. Bird, E. Kris, M. Choe και J. Pelling, «Dietary energy and fat effects on tumor promotion.,» *Cancer Research*, 1992.
- [21] M. Chung, H. Kasai, S. Nishimura και B. Yu, «Protection of DNA damage by dietary restriction.,» *Free Radical Biology and Medicine*, 1992.
- [22] R. Prentice και L. Shepard, «Dietary fat and Cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption.,» *cancer causes & control*, 1990.
- [23] E. Giovannucci, E. Rimm, A. Ascherio και e. al., «Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men.,» *Journal of the National Cancer Institute*, 1995.
- [24] K. Wakabayashi, M. Nagao, H. Esumi και T. Sugimura, «Food-derived mutagens and carcinogens.,» *Cancer Research*, 1992.
- [25] W. Blot, «Alcohol and Cancer,» *Cancer Research*, αρ. 52, pp. 2119s-2123s, 1 Απρίλιος 1992.
- [26] C. Bartecchi, T. Mackenzie και R. Schrier, «The global tobacco epidemic.,» *Scientific American.*, 1995.
- [27] L. Loeb, V. Ernster, K. Warner, J. Abbots και J. Laszlo, «Smoking and lung cancer: an overview.,» *Cancer Research*, 1984.
- [28] C. Bartecchi, T. Mackenzie και R. Schrier, «The human costs of tobacco use.,» *The New England Journal of Medicine*, 1994.
- [29] J. Kelsey, M. Gammon και E. John, «Reproductive factors and breast cancer.,» *Epidemiologic Reviews*, 1993.
- [30] M. Pike, «Age-related factors in cancers of the breast, ovary and endometrium.,» *Journal of Chronic Diseases*, 1987.

- [31] «American Cancer Society,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/dietandphysicalactivity/alcohol-use-and-cancer>.
- [32] W. Schmid και R. Popham, «The role of drinking and smoking in mortality from cancer and other causes in male alcoholics.,» *Cancer*, 1981.
- [33] K. Straif, A. Cohen και J. Samet, «AIR POLLUTION AND CANCER: IARC Scientific Publication No163,» International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland, 2013.
- [34] «Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=4996&lang=en>.
- [35] IARC, «IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Solar and Ultraviolet Radiation vol 55,» WORLD HEALTH ORGANIZATION The International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1992.
- [36] R. Beasley, C. Lin, L. Hwang και C. Chien, «Hepatocellular Carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan.,» *Lancet*, 1981.
- [37] IARC, «Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori Volume 61,» International Agency for Research on Cancer, 1994.
- [38] F. Chu, «Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures.,» *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1991.
- [39] C. Howson, T. Hiyama και L. Wynder, «The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph.,» *Epidemiology Review*, 1986.
- [40] ΠΑΠΥΡΟΣ-ΛΑΡΟΥΣ-ΜΠΙΤΑΝΙΚΑ, Καρκίνος - Ήπαρ, τόμ. 32, Πάπυρος, p. 160.
- [41] IARC, «International Agency for Research on Cancer,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- [42] Α. Βαλαβανίδης, Ελεύθερες Ρίζες και ο Ρόλος τους στα Βιολογικά Συστήματα., 2006.
- [43] I. FRIDOVICH, «OXYGEN TOXICITY: A RADICAL EXPLANATION,» *The Journal of Experimental Biology*, 1998.
- [44] B. H. Helen WISEMAN, «Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer,» *Biochem. J.*, 1996.

- [45] K. Rahman, «Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors,» *Clinical Interventions in Aging*, 2007.
- [46] E. R. Carlos A. Gonzalez, «Diet and Cancer Prevention: Where We Are, Where We Are Going,» *NUTRITION AND CANCER*, 2006.
- [47] E. R. Carlos Gonzalez, «Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study,» *European journal of cancer*, 2010.
- [48] J. Milner, «Diet and Cancer: Facts and Controversies,» *NUTRITION AND CANCER*, 2013.
- [49] E. J. N. Krinsky, «Carotenoid actions and their relation to health and disease,» *Molecular Aspects of Medicine*, 2005.
- [50] J. E.J., «The role of carotenoids in human health.,» *nutrition in clinical care journal*, 2002.
- [51] K. Hollmana, «Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability,» *Food and Chemical Toxicology*, 1999.
- [52] W. JH, «Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea.,» *Food and Chemical Toxicology*, 1999.
- [53] D. CD, «Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention.,» *Exp Biol Med*, 2007.
- [54] W. G. Goldstein BD., «Free radicals and carcinogenesis.,» *Free radical research communications*, 1990.
- [55] K. SM., «Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism.,» *Critical reviews in oncogenesis*, 1997.
- [56] L. H. Lee KW., «The roles of polyphenols in cancer chemoprevention.,» *BioFactors (Oxford, England)*, 2006.
- [57] R. H. Liu, «Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action,» *The Journal of nutrition*, 2004.
- [58] W. G. Scalbert A., «Dietary intake and bioavailability of polyphenols.,» *The Journal of nutrition*, 2000.
- [59] V. J. e. al, «Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables,» *Journal of agricultural and food chemistry*, 1998.
- [60] K. M. Hollman P., «Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids

in man.,» *Biomedicine & pharmacotherapy*, 1997.

- [61] Y. C. e. al, «Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.,» *Annual review of nutrition*, 2001.
- [62] C. AR., «Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer.,» *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 1999.
- [63] C. M. Evans MD., «Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids.,» *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 2004.
- [64] e. a. Thompson HJ., «Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage.,» *Carcinogenesis*, 1999.
- [65] K.-K. M. e. al, «Lipid peroxidation and nutrition.,» *Physiological research*, 2004.
- [66] K. G. Hwang ES., «Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research.,» 2007.
- [67] G. M. Rodgers EH., «The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells.,» *Chemico-biological interactions*, 1998.
- [68] H. S. e. al, «Effects of cruciferous vegetable consumption on urinary metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in singapore chinese.,» *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2004.
- [69] W. Z. Coussens LM., «Inflammation and cancer.,» *Nature*, 2010.
- [70] G. L. Weitzman SA., «Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis.,» *Blood*, 1990.
- [71] J. S. Bastian H., «The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer.,» *Molecular cancer*, 2013.
- [72] e. a. Salminen A., «Phytochemicals suppress nuclear factor- κ B signaling: impact on health span and the aging process.,» *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 2012.
- [73] e. a. Shen G., «Regulation of Nrf2, NF-kappaB, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents.,» *Antioxidants & redox signaling*, 2005.
- [74] K. C. e. al, «Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro.,» *Cancer letters*, 1991.

- [75] F. T. e. al, «Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis.,» *Cancer research*, 1997.
- [76] D. M. M. Rang H. P., φαρμακολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισσιανός, 2013.
- [77] O. K. e. al, «Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription.,» *Mutation research*, 2004.
- [78] K. J. Surh YJ., «Cancer preventive phytochemicals as speed breakers in inflammatory signaling involved in aberrant COX-2 expression.,» *Current cancer drug targets*, 2007.
- [79] e. a. Wang Dan, «Phytochemicals Attenuating Aberrant Activation of β -Catenin in Cancer Cells.,» *PloS one*, 2012.
- [80] R. S. e. al, «Modulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by bioactive food components.,» *Carcinogenesis*, 2012.
- [81] Α. Βαλαβανίδης, Φυτοχημικές ουσίες της διατροφής μα αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες., 2011.
- [82] Πάπυρος-Λαρούς-Μπρυτάνικα.
- [83] «Archipelagos' Wildlife Library,» 2013. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://wildlife-archipelago.gr/>.
- [84] «el.wikipedia.org,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://el.wikipedia.org/wiki/Χαμοκέρασο>.
- [85] «el.wikipedia.org/,» 2013. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CE%BC%CE%AD%CE%BF%CF%85%CF%81%CE%BF>.
- [86] «el.wikipedia.org,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://el.wikipedia.org/wiki/Σμέουρο>.
- [87] «https://en.wikipedia.org/wiki/Hep_G2,» 2017. [Ηλεκτρονικό]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Hep_G2.
- [88] D. A. Scudiero, «Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.,» *CANCER RESEARCH*, pp. 4827-4833., 19 1988.
- [89] Michael V. Berridge et al, «Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.,» *BIOTECHNOLOGY ANNUAL REVIEW*, 2005.

- [90] B. S. Y. L. Y. Z. BINGYAN ZHU, «Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice,» *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 2016.
- [91] F.-M. S. Y.-L. C. C.-L. H. G.-C. Y. C.-J. W. Chiung-Man Tsai, «Molecular mechanism depressing PMA-induced invasive behaviors in human lung adenocarcinoma cells by cis- and trans-cinnamic acid,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013.
- [92] G. Block, B. Patterson και A. Subar, «Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiologicalevidence,» *Nutr Cancer*, αρ. 18, pp. 1-29, 1992.
- [93] I. International Agency for Research on Cancer, «International Agency for Research on Cancer, IARC,» 2015. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#>.
- [94] Cancer Research UK, «www.cancerresearchuk.org,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/incidence/age#heading-Zero>.
- [95] I. K. e. al, «An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements.,» *Biochemical and biophysical research communications*, 1997.
- [96] O. H. Murakami A., «Cancer-preventive anti-oxidants that attenuate free radical generation by inflammatory cells.,» *Biological chemistry*, 2006.