

Επίδραση φυσικών προϊόντων σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος

-

Μηχανιστική ανάλυση

Συνεργασία με τη Μονάδα Κλινικής και Εργαστηριακής Έρευνας, Εργαστήριο Μελετών Εντατικής και Επείγουσας Ιατρικής «Γ. Π. Λιβανός» και το Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιοϊατρικής Έρευνας και Εκπαίδευσης «Μ. Σίμου», Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Διπλωματική Εργασία:
Παπαζήση Μαριάννα

Επιβλέπων Καθηγητής: Κέκος Δημήτριος
Επιστημονική Υπεύθυνος: Λουτράρη Ελένη

Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

Στον παππού μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα ερευνητικά εργαστήρια «Γ. Π. Λιβανός και Μ. Σίμου» της Α' Κλινικής Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επιστημονική επίβλεψη της Δρ. Ελένης Λουτράρη.

Ξεκινώντας αυτό το κείμενο, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Δημήτριο Κέκο και τον ομότιμο καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση, για την μεγάλη προθυμία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν ώστε να βρω τόσο ένα θέμα που να ταιριάζει στα ενδιαφέροντά μου, όσο και το κατάλληλο μέρος για να εκπονήσω τα πειράματά μου. Χάρη σε αυτούς ήρθα σε επαφή με τη Δρ. Ελένη Λουτράρη, ερευνήτρια στην Α' Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, η οποία αμέσως δέχτηκε να συνεργαστούμε. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την υπομονή που έδειξε τον τελευταίο χρόνο, καθώς, ομολογουμένως, στην αρχή δεν ήμουν τόσο εξοικειωμένη με το συγκεκριμένο εργαστηριακό περιβάλλον και δε διέθετα το κατάλληλο βιολογικό υπόβαθρο. Ωστόσο, η ίδια ήταν πάντα διαθέσιμη να βοηθήσει και να προσφέρει τις γνώσεις και τις συμβουλές της. Επίσης, πολύ σημαντική για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας ήταν και η ενασχόληση της με το κείμενο που είναι αυτή τη στιγμή στα χέρια σας, καθώς η επιμονή της στις λεπτομέρειες με έκανε κι εμένα πιο προσεκτική.

Συνεχίζοντας, δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου, ειδικά το Σταύρο, την Έλλη και τον Παναγιώτη, που αποτέλεσαν την εργαστηριακή μου συντροφιά, την παρέα μου, όλον αυτό τον καιρό στο Θώρακα, κάνοντας την παραμονή μου εκεί πολύ πιο εύκολη και χαρούμενη. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, όμως, πάει στον άνθρωπο που μισεί τις ευχαριστίες, τον Παναγιώτη. Ο Παναγιώτης, ο υποψήφιος διδάκτορας στου οποίου το ερευνητικό έργο βοήθησα με την παρούσα διπλωματική εργασία, ήταν ο άνθρωπος που ήταν, κυριολεκτικά, πάντα εκεί! Εντός και εκτός εργαστηρίου, πάντα παρών να με βοηθάει, να με ακούει, να με ηρεμεί όταν αυτό χρειαζόταν, είναι ο κύριος λόγος που η διπλωματική αυτή εργασία ολοκληρώθηκε επιτυχώς.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες στην οικογένεια και τους φίλους μου, που ο καθένας με το δικό του τρόπο συνέβαλαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και στη συνολική ακαδημαϊκή μου πορεία ως τώρα. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω ευγνωμοσύνη προς το Ρήγα και τη Νατάσα, που ήταν μαζί μου τις τελευταίες στιγμές της συγγραφής.

Μαριάννα Παπαζήση

Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

Περίληψη

Το Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma, HCC) αποτελεί έναν τύπο καρκίνου με αυξημένη αγγειογενετική δράση, που στην πλειοψηφία των περιπτώσεων συνοδεύεται από προχωρημένη ίνωση ή κίρρωση και χρόνια φλεγμονή του ήπατος, ως αποτέλεσμα διαφόρων αρχικών αιτιολογικών παραγόντων (ιογενείς ηπατίτιδες Β και C, χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, διατροφική έκθεση στην αφλατοξίνη Β1, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος). Δεδομένων των σύνθετων μοριακών μηχανισμών που απαρτίζουν το ετερογενές μοριακό προφίλ της νόσου, οι σύγχρονες έρευνες για την πρόληψη και τη θεραπεία της εξετάζουν προσεγγίσεις που στοχοποιούν πολλαπλούς μοριακούς παράγοντες.

Στο πλαίσιο αυτό, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην αξιοποίηση φυτικών προϊόντων, αφού εμφανίζουν πολλαπλή βιοδραστικότητα, ενώ δρουν συνεργιστικά με άλλα φυσικά ή/και συνθετικά προϊόντα, καθώς και με καθιερωμένα αντι-καρκινικά φάρμακα και θεραπείες. Μια χαρακτηριστική ομάδα ενώσεων φυτικής προέλευσης, με ευρέως γνωστή αντιοξειδωτική δράση, που εμφανίζει μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον είναι αυτή των πολυφαινολικών ενώσεων. Στην ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνεται ο γαλλικός επιγαλλοκατεχουλεστέρας (Epigallocatechin Gallate, EGCG), που αποτελεί την κυριότερη κατεχίνη του πράσινου τσαγιού και έχει αποδεδειγμένη αντικαρκινική και προστατευτική δράση σε ανθρώπινα HCC.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εντάσσεται στην προσπάθεια της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου της Δρ. Ελένης Λουτράρη να διερευνηθούν οι μηχανισμοί δράσης συγκεκριμένων φυσικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται ως φαμακοτρόφιμα, συμπεριλαμβανομένης της EGCG, έναντι HCC κυτταρικών σειρών σε επίπεδο μεταβολών έκφρασης ολόκληρου του γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η πειραματική επιβεβαίωση μέρους αποτελεσμάτων αλληλούχισης RNA (RNA sequencing, RNA-seq) του εργαστηρίου με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής σε συνδυασμό με την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-Time RT-qPCR).

Για τον σκοπό αυτό καλλιεργήθηκαν κύτταρα της καρκινικής σειράς Hep3B, τα οποία εκτέθηκαν σε προεπιλεγμένη συγκέντρωση EGCG (25 μ M), παρουσία ή απουσία μίγματος ερεθισμάτων (TGF- α , IL-6, IL-1b) που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση των HCC με το μικροπεριβάλλον τους, προωθώντας την ενεργοποίηση σημαντικών προ-καρκινικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Κατόπιν απομόνωσης και ελέγχου της καθαρότητας του ολικού RNA των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε *in vitro* αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και ανάλυση με Real-Time qPCR της έκφρασης των γονιδίων ADAMTS9, CLIC3, HSPA2, SERPINE1, HSPB1, PDGFRB και MMP9. Τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν με βάση την προηγηθείσα βιοπληροφορική ανάλυση των RNA-seq δεδομένων, καθώς η μεταβολή στην έκφρασή τους βρέθηκε να συνδέεται στατιστικά σημαντικά με βιολογικές διαδικασίες/μονοπάτια σχετιζόμενα με την αγγειογένεση, τη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, την αλληλεπίδραση με την εξωκυττάρια μήτρα και την κυτταρική μετανάστευση. Σημειώνεται ότι η μέθοδος Real-Time RT-qPCR εφαρμόστηκε τόσο σε ανεξάρτητο πείραμα, όσο και στο υλικό RNA που χρησιμοποιήθηκε για το RNA-seq.

Από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων Real-Time RT-qPCR προέκυψε ότι τα γονίδια ADAMTS9, MMP9 και SERPINE1 υπερεκφράζονται, ενώ τα PDGFRB, HSPB1, HSPA2 και CLIC3 υποεκφράζονται μετά από έκθεση σε EGCG σε σχέση με το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν τα δεδομένα του RNA-seq και, συνεπώς, υποστηρίζουν την εγκυρότητα της βιοπληροφορικής ανάλυσης που υποδεικνύει ότι οι δράσεις του EGCG διαμεσολαβούνται από μεταβολές στη έκφραση γονιδίων που

συνδέονται στατιστικά σημαντικά με αξιόλογες για την πρόοδο του καρκίνου βιολογικές διαδικασίες (αγγειογένεση, κυτταρική αύξηση, εξωκυττάρια μήτρα, κυτταρική μετανάστευση). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα, σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, υποδηλώνουν ότι η διαφορετική γονιδιακή έκφραση πιθανά συνδέεται με την επίδραση του EGCG σε κομβικούς μεταγραφικούς παράγοντες ή/και στην παρεμπόδιση της μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων στα ανθρώπινα HCC.

Abstract

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is a type of cancer characterized by increased angiogenesis, that develops in a background of cirrhosis and chronic inflammation. HCC incidence is associated with multiple causative factors, the most important of which being chronic infection with hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV), excessive consumption of alcohol, dietary exposure to aflatoxin B1 and non alcoholic fatty liver disease. Due to the complex molecular mechanisms and multifactorial etiology of HCC, research for cancer prevention and treatment nowadays focuses on multi-target pharmacologic approaches.

In this spirit, the scientific community shows an intense interest in the potential use of plant-derived products, due to their multiple bioactivity and synergistic effects with other natural or synthetic products, established anticancer drugs and therapies. A group of plant-derived compounds, widely known for their antioxidant activity, that is promising for pharmaceutical development, is plant phenolics. A member of this class is Epigallocatechin Gallate (EGCG), the main green tea catechin, with known anticancer and protective properties in human HCC.

The present diploma thesis is a small part of Dr. H. Loutrari's research team's work, concerning the mechanisms of action of specific natural products described as nutraceuticals (including EGCG) on whole-genome gene expression changes in HCC cell lines. More elaborately, the aim of this thesis is the experimental validation of part of the existing RNA-seq data through the Real Time Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (Real-Time RT-qPCR) method.

For this purpose, Hep3B cancer cell cultures were seeded and subsequently exposed to a selected EGCG dose (25 μ M), in the presence or absence of a proinflammatory stimuli mixture (TGF- α , IL-6, IL-1 β) known for its role in HCC interactions with the tumor microenvironment and activation of significant precancerous signaling pathways. The total isolated RNA from the cancer cells was subjected to quality assessment and then used for *in vitro* reverse transcription (cDNA synthesis) and Real-Time qPCR analysis. This analysis focused on the expression of the genes ADAMTS9, CLIC3, HSPA2, SERPINE1, HSPB1, PDGFRB and MMP9. Those genes occurred from previous bioinformatic analysis of the RNA-seq data, because their statistically significant differential expression is associated with biological processes/pathways related to angiogenesis, cell growth control, cell-extracellular matrix (ECM) interactions and cell migration. It is noted that the Real-Time RT-qPCR method was applied both in an independent experiment and in the isolated RNA that was used for the RNA sequencing.

Statistical analysis of the experimental data showed overexpression of genes ADAMTS9, MMP9 and SERPINE1 and underexpression of genes PDGFRB, HSPB1, HSPA2 and CLIC3 after exposure to EGCG compared to the control sample. These results confirm the previous RNA-seq data and, therefore, validate the bioinformatics analysis which indicates that EGCG effects mediate statistically significant changes in the expression of genes connected to biological processes of great importance to cancer development (angiogenesis, cell growth, ECM, cell migration). Moreover, the aforementioned results, in conjunction with the existing literature, suggest that the differential expression of the examined genes in HCC is possibly associated with EGCG's influence on crucial transcription factors and/or DNA-methylation inhibition.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	1
1. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	1
Γενικές πληροφορίες για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	1
Επιδημιολογία	1
Κύριοι παράγοντες κινδύνου.....	2
2. Εμπλεκόμενοι μοριακοί μηχανισμοί.....	7
Γενικές πληροφορίες	7
Εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια	9
Φλεγμονή.....	12
Αγγειογένεση.....	14
Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.....	14
Επανενεργοποίηση της ανάστροφης τρανσκριπτάσης της τελομεράσης.....	16
3. Φυσικές ενώσεις και φαρμακοτρόφιμα	17
Φαρμακοτρόφιμα	17
Φυσικά προϊόντα	17
Φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης	18
Χαρακτηριστικές ενώσεις προϊόντων φυτικής προέλευσης.....	19
Πολυφαινολικές ενώσεις.....	20
Γαλλικός επιγαλλοκατεχουλεστέρας (Epigallocatechin Gallate, EGCG).....	23
Σκοπός.....	29
Πειραματικό μέρος	31
1. Πειραματική διαδικασία.....	31
2. Υλικά και Μέθοδοι	32
2.1 Υλικά.....	32
2.2 Μέθοδοι.....	34
2.2.1 Παρασκευή υλικών καλλιέργειας.....	34
2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων	35
2.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	35
2.2.4 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων.....	36
2.2.5 Μέτρηση κυττάρων και στρώσιμο σε πλάκες 96 φρεατίων	37
2.2.6 Μέθοδος MTT	40
2.2.7 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	40
2.2.8 Έκθεση κυττάρων σε EGCG	41
2.2.9 Μέτρηση συγκέντρωσης και αξιολόγηση δείγματος RNA	42

2.2.10 Μέθοδος Real-time Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction.....	42
2.2.11 Επεξεργασία και ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων	47
Αποτελέσματα	50
1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	50
2. Αποτελέσματα έκθεσης των κυττάρων σε EGCG	51
3. Αποτελέσματα Real Time RT-PCR	53
Συζήτηση αποτελεσμάτων	55
Βιβλιογραφία	61

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Πορεία ανάπτυξης ηπατοκαρκινώματος σε υπόβαθρο ηπατίτιδας C.....	4
Εικόνα 2. Πιθανοί κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί ηπατοκαρκινογένεσης και εξέλιξης του HCC, ως αποτέλεσμα διαφόρων αρχικών αιτιολογικών παραγόντων. Σημειώνονται επιγραμματικά οι βασικοί μοριακοί παράγοντες που ρυθμίζουν αυτούς τους μηχανισμούς στο HCC.....	8
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής παθογένεσης του ηπατοκαρκινώματος. Η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που προωθούν τον όγκο είναι καθοριστικός παράγοντας για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του ήπατος. Αλλαγές που εντοπίζονται σε όλους τους όγκους αφορούν απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής λόγω ενεργοποίησης TERT,νεοαγγειογένεση (λόγω ενεργοποίησης VEGF, PDGF, αγγειοποιητίνης κλπ) και αντίσταση σε αντι-αυξητικά σήματα (εξαιτίας διαταραχών στα γονίδια p53, p21, Rb, cyclin D1) και απόπτωση	10
Εικόνα 4. Απλούστερη δομή φαινόλης	20
Εικόνα 5. Δομή φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και τανινών	21
Εικόνα 6. Βιοσύνθεση φυτοφαινολών. Επεξηγούνται οι συντομογραφίες CH: chalcone isomerase , F3OH: flavanone 3-hydroxylase,ISF: isoflavone synthase, FS: flavone synthase, FLS: flavonol synthase,DHFR: dihydroflavonol reductase, AS: anthocyanin synthase	22
Εικόνα 7. Η ανηγμένη μορφή των φυτοφαινολών δρα ως αντιοξειδωτικό, ενώ η οξειδωμένη έχει προ-οξειδωτική δράση	23
Εικόνα 8. Βιολογική δράση και μηχανισμοί των κατεχινών του τσαγιού (κυρίως του EGCG)	24
Εικόνα 9. Χημική δομή EGCG	25
Εικόνα 10. Χημική αντίδραση μεθυλίωσης της κυτοσίνης	26
Εικόνα 11. Επίδραση EGCG στην έκφραση του miRNA	28
Εικόνα 12. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	37
Εικόνα 13. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	38
Εικόνα 14. Είδη εκκινητών για αντίστροφη μεταγραφή	43
Εικόνα 15. Μόρια SYBR Green 1 που συνδέονται σε δίκλιωνα μόρια DNA	45
Εικόνα 16. Παράδειγμα καμπύλης ενίσχυσης Real-Time PCR. Το όριο ανίχνευσης (threshold line) της έντασης του φθορισμού βρίσκεται πάνω από το υπόβαθρο του «θορύβου». Στον οριζόντιο άξονα σημειώνεται ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την επίτευξη της τιμής threshold, ενώ στον κατακόρυφο φαίνεται η τιμή των επιπέδων φθορισμού.....	48
Εικόνα 17. Αποτελέσματα μεθόδου MTT για εύρος συγκεντρώσεων κυττάρων από 25000 ως 3125 κύτταρα σε πλάκα 96 φρεατίων	51
Εικόνα 18. Αποτελέσματα MTT μετά τη 48ωρη έκθεση των κυττάρων στις προς εξέταση συγκεντρώσεις.....	51
Εικόνα 19. Δραστικό τμήμα EGCG (Galloyl moiety)	60

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Εξεταζόμενα γονίδια και βιολογικές λειτουργίες	30
Πίνακας 2. Επιλεγμένα αντιδραστήρια και εταιρείες παραγωγής τους.....	32
Πίνακας 3. Χρησιμοποιούμενες συσκευές και εταιρείες παραγωγής τους	32
Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα και εταιρείες παραγωγής τους	33
Πίνακας 5. Συστατικά αντιδρώντος μίγματος	44
Πίνακας 6. Απαιτούμενες ποσότητες για αποκλειστική χρήση ενός εκκινητή	44
Πίνακας 7. Αναλογίες αντιδραστηρίων	46
Πίνακας 8. Συνθήκες έκθεσης κυττάρων	48
Πίνακας 9. Επεξήγηση συμβόλων επιπέδου σημαντικότητας	49
Πίνακας 10. Αποτελέσματα μη παραμετρικής One-Way ANOVA	52
Πίνακας 11. Συγκέντρωση και καθαρότητα απομονωμένου RNA	53

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς.....	50
Διάγραμμα 2. Επί τοις εκατό μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης ως προς το δείγμα Control.	52
Διάγραμμα 3. Μεταβολή της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων ως προς το control (DMSO) κατά την έκθεση σε EGCG σε συνθήκες STIM, εκφρασμένη σε λογαριθμική (log2) κλίμακα.....	54

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Συντμήσεις	Επεξήγηση
ADAM	A Digestin and Metalloproteinase
ADAMTS	A Digestin and Metalloproteinase with Thrombospondin
ADAMTS9	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 9
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BBV	Blood Born Virus
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
C4H	Cinnamate-4-Hydroxylase
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
cDNA	Complementary DNA
CHS	Chalcone Synthase
CLIC3	Chloride Intracellular Channel 3
CTL	Control
DC	Dendritic Cell
DGCR8	DiGeorge syndrome Crucial Region of gene 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNMT	DNA Methyltransferases
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSHEA	Dietary Supplement Health and Education Act (of 1994)
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGCG	Epigallocatechin Gallate

EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GSRP	Gene Specific Reverse Primer
HBV	Hepatitis B Virus
HCA-CoA	Hydroxycinnamoyl CoA
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HIF-1a	Hypoxia-Inducible Factor 1a
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSPA2	Heat Shock Protein Family A (HSP70) Member 2
HSPB1	Heat Shock Protein Family B (small) Member 1
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-6	Interleukin 6
JAK	Janus Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Methyl Ethyl Ketone
MEM	Minimum Essential Medium
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non Alcoholic Steatic Hepatitis
NEA	Non Essential Amino acids

NFκB	Nuclear Factor κB
NGS	Nottingham Grading System
NK cells	Natural Killer cells
NTC	No Template Control
OD	Optical Density
oligo-DT	oligo-deoxythimidine
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor – 1
PAL	Phenylalamine Ammonia-Lyase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta
PI3K	Phosphatidylinositide-3-kinase
PkB	Protein kinase B
pri-miRNA	primary miRNA
RB	Retinoblastoma
Real Time RT-PCR	Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Real Time RT-qPCR	Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEM	Standard Error of Means
SERPINE1	Serpine Family E Member 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STIM	Stimuli
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase

TGF	Transforming Growth Factor
TGM2	Transglutaminase 2
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Εισαγωγή

1. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Γενικές πληροφορίες για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Το Ηπάτωμα ή Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma, HCC) είναι η έκτη συχνότερη νεοπλασία (85-90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος) και η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου που συνδέεται με καρκίνο παγκοσμίως [1, 2]. Αποτελεί την πέμπτη πιο συχνή μορφή καρκίνου στον ανδρικό πληθυσμό και την έβδομη στον γυναικείο πληθυσμό, με συχνότητα εμφάνισης 500.000 με 1.000.000 νέων περιστατικών και 600.000 θανάτων ετησίως [1, 3]. Έχει μέγιστη συχνότητα εμφάνισης σε άτομα ηλικίας 70 ετών, ενώ σπάνια εντοπίζεται και σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών. Στην πλειονότητα των ασθενών αναπτύσσεται σε υπόβαθρο ίνωσης ή κίρρωσης λόγω ηπατίτιδας Β ή C, χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ, διατροφικής έκθεσης στην αφλατοξίνη Β1, καθώς και από μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος. Άλλοι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν κληρονομική αιμοχρωμάτωση, ανεπάρκεια α1-αντιτρυψίνης, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, πορφυρία, αυτοάνοση ηπατίτιδα και τη νόσο Wilson [1, 2].

Επιδημιολογία

Η διαφορετική κατανομή του ηπατοκαρκινώματος στις γεωγραφικές περιοχές σχετίζεται με την ύπαρξη διαφορετικών παραγόντων κινδύνου. Μεγάλο ποσοστό κρουσμάτων της συγκεκριμένης νόσου (~85%) εντοπίζεται σε αναπτυσσόμενες χώρες, με αυξημένη συχνότητα σε περιοχές που παρατηρείται ενδημική λοίμωξη του ιού της ηπατίτιδας Β, κυρίως σε τμήματα της νοτιοανατολικής Ασίας και της υποσαχάριας Αφρικής [1, 2, 4]. Αντιθέτως, στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη και την Ιαπωνία κύριος παράγοντας κινδύνου είναι ο ιός της ηπατίτιδας C, ο ρυθμός εξάπλωσης του οποίου συνδέεται άμεσα με την αύξηση της εμφάνισης της νόσου στις ανεπτυγμένες χώρες. Στις περιοχές αυτές και άλλοι παράγοντες κινδύνου, όπως η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, μπορεί να δρουν ανεξάρτητα ή συνεργιστικά με τον ιό της ηπατίτιδας C και –σε μικρότερο βαθμό– της Β. Τέλος, ανεξάρτητος παράγοντας που σχετίζεται με το ηπάτωμα είναι και ο διαβήτης [1, 4].

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα ποσοστά εμφάνισης του ηπατοκαρκινώματος διαφέρουν σημαντικά μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών εθνικοτήτων που κατοικούν στην ίδια γεωγραφική περιοχή [5]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι Η.Π.Α., στις οποίες σε ασθενείς κάθε ηλικίας και φύλου η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου καρκίνου είναι δύο φορές μεγαλύτερη σε άτομα ασιατικής καταγωγής απ' ό,τι σε Αφροαμερικανούς, οι οποίοι με τη σειρά τους έχουν διπλάσια ποσοστά εμφάνισης ηπατοκαρκινώματος συγκριτικά με τους Καυκάσιους της ίδιας περιοχής. Η διαφορά αυτή αντικατοπτρίζει τις διαφορές στην πιθανότητα και τον χρόνο έκθεσης των διαφορετικών πληθυσμών σε παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατικής νόσου και ηπατοκαρκινώματος [5, 6].

Όσον αφορά την επίπτωση του ηπατοκαρκινώματος στα δύο φύλα, στις περισσότερες περιοχές είναι μεγαλύτερη κατά δύο με τέσσερις φορές στους άνδρες απ' ό,τι στις γυναίκες, με τις μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα να εντοπίζονται σε περιοχές της κεντρικής και νότιας Ευρώπης [5]. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη διαφορετική έκθεση των δύο φύλων στους διάφορους παράγοντες κινδύνου, αφού ο ανδρικός πληθυσμός φαίνεται

να είναι πιο επιρρεπής στην κατανάλωση αλκοόλ, στο κάπνισμα και στη λοίμωξη από τους ιούς της ηπατίτιδας. Επιπλέον, μη περιβαλλοντικοί ενδογενείς παράγοντες που ενδεχομένως δικαιολογούν την μεγαλύτερη επίπτωση του ηπατοκαρκινώματος στο ανδρικό φύλο περιλαμβάνουν υψηλότερες τιμές δείκτη μάζας σώματος και αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων ορμονών [5, 6].

Τέλος, η ηλικιακή κατανομή του ηπατοκαρκινώματος ποικίλει ανάλογα με τους παραπάνω παράγοντες (εθνικότητα, φύλο, αιτιολογία). Γενικά, το ηπατοκαρκίνωμα σπάνια προκύπτει πριν την ηλικία των 40 και έχει μέγιστη συχνότητα σε ηλικία περίπου 70 ετών [1]. Συνήθως, η κρίσιμη ηλικία εμφάνισης στο γυναικείο φύλο είναι κατά 5 χρόνια μεγαλύτερη από το ανδρικό και σε πληθυσμούς χαμηλής επικινδυνότητας τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης αφορούν άτομα ηλικίας 75 ετών και άνω. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρείται και σε υψηλής επικινδυνότητας ασιατικούς πληθυσμούς, ενώ στην Αφρική η μέγιστη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας εντοπίζεται σε άνδρες μεταξύ 60-65 ετών και σε γυναίκες 65-70 ετών [6]. Οι παραπάνω ηλικιακές διακυμάνσεις του ηπατοκαρκινώματος αποδίδονται στον κυρίαρχο ρόλο της ηπατίτιδας του εκάστοτε πληθυσμού, στην ηλικία κατά την οποία συνέβη η λοίμωξη (οι περισσότεροι φορείς της ηπατίτιδας C προσβλήθηκαν κατά την ενήλικη ζωή τους, ενώ οι φορείς της ηπατίτιδας B προσβλήθηκαν σε πολύ μικρή ηλικία), καθώς και από την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου [5, 6].

Κύριοι παράγοντες κινδύνου

Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του ήπατος είναι ιογενείς (χρόνια ηπατίτιδα B και C), τοξικοί (αλκοόλ, αφλατοξίνες), μεταβολικοί (διαβήτης, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, κληρονομική αιμοχρωμάτωση) και σχετικοί με το ανοσοποιητικό σύστημα (πρωτοπαθής χολική κίρρωση, αυτοάνοση ηπατίτιδα). Παρακάτω παρουσιάζονται οι κυριότεροι εξ αυτών:

❖ **Ιός της ηπατίτιδας B (Hepatitis B Virus, HBV)**

Σχεδόν το 50% όλων των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και όλων των περιστατικών που αφορούν παιδιά σχετίζεται με τον HBV [1, 4]. Ο HBV είναι ένας DNA-ιός που προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα και, δρώντας ως μεταλλαξιόγόνος παράγοντας, προκαλεί δευτεροταγείς χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και αυξημένη γενωμική αστάθεια (η γενωμική αστάθεια στον καρκίνο χαρακτηρίζεται από χρωμοσωματικές ανωμαλίες και παραλλαγές στην ποιότητα και ποσότητα του γενετικού υλικού στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων). Είναι γνωστός ως ένας «αιματογενώς μεταδιδόμενος ιός» (Blood Born Virus, BBV) και μπορεί να μεταδοθεί με το αίμα, ωστόσο είναι επίσης παρών και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως είναι το σάλιο, το σπέρμα και τα κολπικά υγρά και κύριοι τρόποι μετάδοσης του είναι η σεξουαλική επαφή, η κάθετη μετάδοση και παρεντερικά [7].

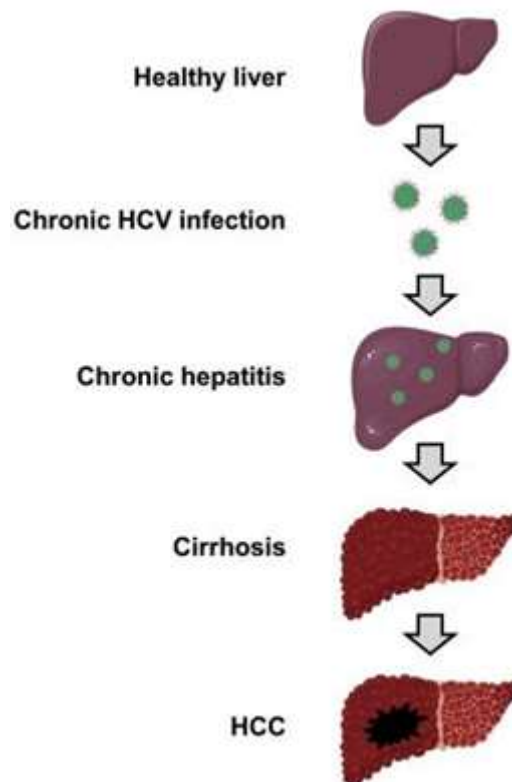
Ο HBV κωδικοποιεί ογκογονικές πρωτεΐνες και άλλους ιικούς παράγοντες, η ανάμιξη των οποίων σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια των ηπατοκυττάρων που αφορούν την έκφραση και τις λειτουργίες συγκεκριμένων γονιδίων οδηγεί σε ηπατικές διαταραχές [3, 8]. Η ανάπτυξη του ηπατοκαρκινώματος μπορεί να επέρχεται είτε ως άμεσο αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης του γενετικού υλικού του ιού στα ηπατοκύτταρα ή ως έμμεση συνέπεια λόγω της προκλειθής από τον ιό φλεγμονής, ίνωσης ή κίρρωσης [9]. Μάλιστα, αυτός είναι ο λόγος που ο κίνδυνος ανάπτυξης ηπατοκαρκινώματος είναι εκατονταπλάσιος σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον HBV συγκριτικά με αυτούς που δεν έχουν μολυνθεί, ενώ σε φορείς του HBV με κίρρωση ο κίνδυνος αυξάνεται ακόμα περισσότερο [2, 4].

❖ **Ιός της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus, HCV)**

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου στην Ιαπωνία και τις χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, καθώς συνδέεται με το 70% των καταγεγραμμένων περιστατικών [3]. Πρόκειται, επίσης, για έναν ιό με μεταλλαξιογόνο δράση που συνήθως συνοδεύεται από κίρρωση και μπορεί να προκαλέσει χρόνια λοίμωξη και ηπατική νόσο, αλλά - σε αντίθεση με τον HBV - απαντάται σχεδόν αποκλειστικά σε ενήλικες και η λοίμωξη με HCV είναι συνήθως ασυμπτωματική στα πρώτα στάδια, καθιστώντας δύσκολη τη διάγνωση κατά τους πρώτους έξι μήνες [3, 5, 10]. Επειδή ανήκει στην κατηγορία των ρετροϊών, ο HCV έχει περιορισμένες δυνατότητες ενσωμάτωσης του γενετικού του υλικού στον ξενιστή, με αποτέλεσμα να οδηγεί σε καρκινογένεση κυρίως μέσω έμμεσων μηχανισμών (χρόνιας φλεγμονής, κυτταρικού θανάτου και πολλαπλασιασμού) [10, 11].

Εκτός από τα ηπατικά κύτταρα, επηρεάζει και άλλες κατηγορίες κυττάρων, όπως τα λευκά αιμοσφαίρια και τα επιθηλιακά κύτταρα διαφόρων οργάνων. Ωστόσο, η ηπατοκαρκινογένεση είναι συνέπεια γενετικών μεταλλάξεων των ηπατικών κυττάρων. Η συμμετοχή του HCV στην πρόκληση του ηπατοκαρκινώματος αφορά άμεσους και έμμεσους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση και τη δημιουργία ίνωσης, καθώς και την αλληλεπίδραση με ανοσοποιητικά και μεταβολικά συστήματα, μέσω πρόκλησης πολυμορφισμών, κυρίως αντικαταστάσεων ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [10, 11].

Τέλος, σημειώνεται ότι η χρόνια ηπατίτιδα C είναι πιο οξεία σε ασθενείς θετικούς στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), προκαλώντας κίρρωση και ηπατική ανεπάρκεια σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Η συλλοίμωξη των δύο ιών καθίσταται εφικτή - και μάλιστα είναι αρκετά συχνό φαινόμενο - λόγω των κοινών τρόπων μετάδοσης τους. Όπως και στην περίπτωση του HIV, η μετάδοση του HCV πραγματοποιείται μέσω της έκθεσης σε μολυσμένο αίμα και παράγωγα αυτού. Κατά κύριο λόγο η έκθεση αυτή οφείλεται σε ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών, μεταμόσχευση μολυσμένων οργάνων, μετάγγιση μολυσμένου αίματος και αιμοδιάλυση, ενώ σποραδικά κρούσματα λοίμωξης HCV έχουν αποδοθεί σε κάθετη μετάδοση, σεξουαλικές επαφές χωρίς προστασία και ενδορινική χρήση κοκαΐνης [10].



Εικόνα 1. Πορεία ανάπτυξης ηπατοκαρκινώματος σε υπόβαθρο ηπατίτιδας C [11]

❖ Χρόνια κατανάλωση αλκοόλ

Ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο επικύρωσε το 1988 την ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης ανάμεσα στη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ και το ηπατοκαρκίνωμα, παρά τα κενά που εξακολουθούν να υπάρχουν στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου. Άλλα άλυτα ζητήματα αφορούν το συγκριτικό κίνδυνο μεταξύ των δύο φύλων και τη συνεργιστική δράση του αλκοόλ και του ιού της ηπατίτιδας B συγκριτικά με το συνδυασμό του αλκοόλ με τον ιό της ηπατίτιδας C.

Παλαιότερες μελέτες σχετικά με τον καρκίνο του ήπατος έδειξαν ότι το αλκοόλ είναι σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου σε περιοχές χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας απ' ό,τι σε περιοχές υψηλής συχνότητας, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη χαμηλότερη μέση κατανάλωση αλκοόλ σε πληθυσμούς υψηλής επικινδυνότητας και/ή στην κυρίαρχη δράση της χρόνιας ηπατίτιδας B, που συγκαλύπτει κάθε επιπρόσθετο κίνδυνο από την κατανάλωση αλκοόλ. Όσον αφορά τη σχέση της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ με την εμφάνιση ηπατοκαρκινώματος παρουσία χρόνιας λοίμωξης από HBV, το τοπίο παραμένει ασαφές. Ωστόσο, οι περισσότερες έρευνες σε πληθυσμούς που ο HCV είναι ο επικρατέστερος ιός καθιστούν το αλκοόλ σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν μικρή διαφορά στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος εξαιτίας του συνδυασμού της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ και του HCV συγκριτικά με το συνδυασμό της με τον HBV. Επιπλέον, υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν τη συσχέτιση του αλκοόλ με το ηπατοκαρκίνωμα απουσία κάποιου τύπου ηπατίτιδας, παρ' όλο που ενδεχομένως για την ανάπτυξη ηπατοκαρκινώματος απαιτούνται υψηλότερα ποσοστά κατανάλωσης απουσία ιογενούς λοίμωξης.

Ένα ακόμα προς εξέταση ερώτημα αφορά τη συνεισφορά της κατανάλωσης αλκοόλ στην ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος στα δύο φύλα. Η μελέτη του, όμως, συναντά δυσκολίες, καθώς οι γυναίκες είναι λιγότερο πιθανό να καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ, αλλά και να εμφανίσουν ηπατοκαρκίνωμα συγκριτικά με τους άνδρες.

Όπως προαναφέρθηκε, ο μηχανισμός με τον οποίο το αλκοόλ αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του ήπατος δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ακόμα, καθώς έρευνες τόσο σε ζώα, όσο και σε ανθρώπους έχουν δώσει ελάχιστες ενδείξεις για την καρκινογόνο δράση της αιθανόλης. Πιθανοί τρόποι δράσης ενδεχομένως να περιλαμβάνουν την παραγωγή ακεταλδεϋδης και ελεύθερων ριζών κατά το μεταβολισμό του αλκοόλ, τροποποίηση της κυτταρικής ανανέωσης, πρόκληση ή επιδείνωση ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών και τροποποιήσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, είναι βέβαιο ότι η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε κίρρωση, η οποία είναι παράγοντας κινδύνου στο 60-90% των περιπτώσεων ηπατοκαρκινώματος. Όμως, η σύνδεση του αλκοόλ με το ηπατοκαρκίνωμα ανεξάρτητα της κίρρωσης είναι λιγότερο σαφής [5].

❖ Έκθεση στην αφλατοξίνη B1

Η αφλατοξίνη B1 (AFB1) είναι μια μυκοτοξίνη που παράγεται από μύκητες του γένους *Aspergillus* στην Ασία και την υποσαχάρια Αφρική, όπου οι κλιματικές συνθήκες και οι μέθοδοι αποθήκευσης τροφίμων σε συνθήκες ζέστης και υγρασίας διευκολύνουν τη μόλυνση τροφίμων, όπως το σιτάρι, το καλαμπόκι, τα φυστίκια και τα όσπρια [3, 5]. Το 1987 ο Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο αναγνώρισε την καρκινογόνο δράση των αφλατοξινών στον άνθρωπο, με έρευνες σε ζώα να υποδεικνύουν την AFB1 ως την πιο διαδεδομένη από τις τέσσερις κύριες αφλατοξίνες (B1, B2, G1, G2) [5].

Περιοχές με υψηλή διατροφική έκθεση στην AFB1 συμπίπτουν με περιοχές με αυξημένο επιπολασμό του ηπατώματος. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι αυξημένη πρόσληψη της AFB1 σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β είναι ένας επιπρόσθετος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του ήπατος, ενώ μεγαλύτερες πιθανότητες για την ανάπτυξη ηπατοκαρκινώματος έχουν άτομα τα οποία έχουν εκτεθεί και στην AFB1 και στον HBV [3]. Πιο αναλυτικά, από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στη Σανγκάη εκτιμάται ότι η έκθεση σε AFB1 τετραπλασιάζει τις πιθανότητες ανάπτυξης ηπατώματος, η λοίμωξη με HBV τις επταπλασιάζει και ο συνδυασμός των δύο αυξάνει τον κίνδυνο κατά εξήντα φορές.[3, 12]

Στις προαναφερόμενες έρευνες γίνεται ο ισχυρισμός ότι η κύρια μετάλλαξη που αποδίδεται στην AFB1 είναι η σημειακή μετάλλαξη μεταστροφής γουανίνης σε θυμίνη στο κωδικόνιο 249 του ογκοκατασταλατικού γονιδίου p53, η οποία είναι κοινή σε μεγάλο ποσοστό των ανθρώπινων ηπατικών όγκων και σχετίζεται με το μέγεθός τους για κακοήθεια βαθμού 2 και 3 του συστήματος Νότινγκαμ (Nottingham Grading System, NGS) [3, 12]. Πράγματι, η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα έρευνας που δημοσιεύτηκε το 1991[13], σύμφωνα με τα οποία μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο κωδικόνιο παρουσιάζονταν μόνο σε ασθενείς που κατοικούσαν σε περιοχές με γνωστή υψηλή έκθεση στην αφλατοξίνη [12, 13].

❖ Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) χαρακτηρίζεται από συσσώρευση λίπους (τριγλυκεριδίων) στα ηπατοκύτταρα, απουσία ιστορικού υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ [14]. Περιλαμβάνει δύο οντότητες:

1. Την καλοήθεστη μη αλκοολική ηπατοστεάτωση, η οποία προκαλείται από κατακράτηση λιπιδίων μέσα στα ηπατικά κύτταρα, εξαιτίας της ανισορροπίας μεταξύ της

πρόσληψης και σύνθεσης λιπαρών οξέων έναντι της οξειδωσης και εξόδου τους από το ήπαρ [15].

2. Τη σοβαρότερη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (Non Alcoholic Steatic Hepatitis, NASH), που εμφανίζει σύνθετη παθολογία, η οποία εκτός από τα στοιχεία της ηπατοστεάτωσης περιλαμβάνει και στοιχεία χρόνιας φλεγμονής, νέκρωσης και ίνωσης [14-16]. Η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα εξελίσσεται σε κίρρωση του ήπατος στο 10-20% των περιπτώσεων μέσα σε χρονικό διάστημα δέκα ετών και μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές όπως πυλαία υπέρταση, ηπατική ανεπάρκεια και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [14].

Δεδομένου ότι πρόκειται για μια ηπατοπάθεια που μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση ήπατος, τα στάδια της NAFLD μπορούν θεωρητικά να είναι:

Ηπατοστεάτωση → Στεατοηπατίτιδα → Κίρρωση → Καρκίνος

Η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελούν αυτοτελή παράγοντα μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος και δεδομένου ότι το 80% των ατόμων σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 είναι άτομα παχύσαρκα, εξηγείται έμμεσα και η συσχέτιση με το διαβήτη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία αντιρρόπησης της λιπόλυσης, με συνέπεια να αυξάνεται η κυκλοφορία των ελεύθερων λιπαρών οξέων που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό και εισέρχονται στο ήπαρ [15].

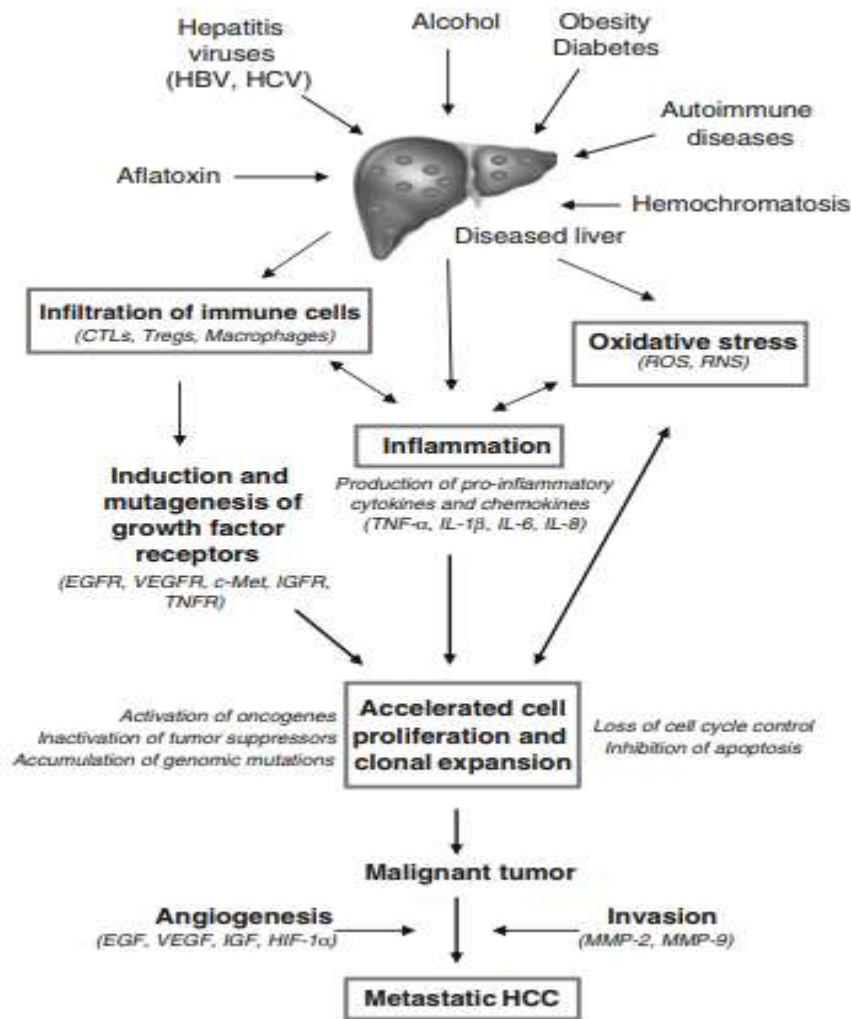
Άτομα με NAFLD που έχει εξελιχθεί σε κίρρωση εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος, αλλά το ηπατοκαρκίνωμα μπορεί σπανιότερα να εμφανιστεί και σε ασθενείς με μικρού βαθμού ή και καθόλου ίνωση [14, 16]. Αυτό συμβαίνει επειδή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η NAFLD αναπτύσσεται σε υπόβαθρο παχυσαρκίας και διαβήτη, που είναι ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος. Σε συνδυασμό με κίρρωση ή ανεξάρτητα αυτής, η νόσος δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον που ευνοεί την ογκογένεση, λόγω της συσχέτισης της με χρόνια πλεόνασμα θρεπτικών συστατικών και την αναδιαμόρφωση του λιπώδους ιστού [14]. Η ογκογένεση και η εξέλιξη του ηπατοκαρκινώματος είναι αποτέλεσμα πολλαπλών μηχανισμών, μεταξύ των οποίων είναι η φλεγμονή, οι ενδοκρινείς τροποποιήσεις και οι διαταραχές στο μεταβολισμό υδρογονανθράκων, λιπιδίων και σιδήρου [16].

2. Εμπλεκόμενοι μοριακοί μηχανισμοί

Γενικές πληροφορίες

Η ηπατοκαρκινογένεση είναι μια αργή διαδικασία με σύνθετους μοριακούς μηχανισμούς, που απαρτίζονται από ένα σύνολο σηματοδοτικών μονοπατιών και μοριακών παραγόντων, η τροποποίηση των οποίων οδηγεί σε ένα ετερογενές μοριακό προφίλ [4, 17, 18]. Όπως κάθε μορφή καρκίνου, έτσι και το ηπατοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από μια πληθώρα γενετικών, ιογενών και περιβαλλοντικών παραγόντων που δημιουργούν μια σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων στα ηπατοκύτταρα, δίνοντας έναυσμα σε μια αλληλουχία γεγονότων που ξεκινά από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την υπερπλασία, εξελίσσεται σε δυσπλασία και καταλήγει σε κακοήθεια [19].

Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των περιπτώσεων, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα συνοδεύεται από κίρρωση ή προχωρημένη ίνωση και χρόνια φλεγμονή του ήπατος, που είναι αποτελέσματα διαφόρων αρχικών αιτιολογικών παραγόντων [1, 20]. Όταν ο ηπατικός μεταβολισμός μειώνεται σε κάποιο βαθμό και αδυνατεί να μετατρέψει φαρμακευτικές και χημικές ουσίες σε μη ενεργές ή μη ανοσογενείς ουσίες, τα ενδιάμεσα προϊόντα που σχηματίζονται στον ηπατικό ιστό πιθανώς να προκαλέσουν ζημιά στα ηπατοκύτταρα και να πυροδοτήσουν την έκκριση κυτοκινών, χημειοκινών, μεσολαβητών, καθώς και δραστικών μορφών οξυγόνου που αυξάνουν το οξειδωτικό στρες και δημιουργούν μια προφλεγμονώδη κατάσταση στο ήπαρ [20, 21]. Αυτή η φλεγμονώδης ανοσολογική απόκριση, σε συνδυασμό με τον απορρυθμισμένο (αυξημένο) κυτταρικό πολλαπλασιασμό συνεισφέρουν στην ηπατοκαρκινογένεση. Επιπλέον, βάση της ογκογένεσης αποτελούν, επίσης, οι αλλαγές στα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια και τη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες ποικίλουν και εξαρτώνται από τους αρχικούς αιτιολογικούς παράγοντες [21]. Σύμφωνα με τον ερευνητή Bert Vogelstein, η ανάπτυξη όγκων παρατηρείται μετά τη διαταραχή τουλάχιστον τριών σηματοδοτικών μονοπατιών, σε αντίθεση με τις αιματολογικές κακοήθειες που είναι απόρροια μιας μόνο γενετικής αλλαγής [22, 23]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία της ηπατοκαρκινογένεσης περιλαμβάνουν γενετικές μεταλλάξεις, υπερέκφραση κυτταρικών πρωτεϊνών, παρεμπόδιση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, υπερέκφραση ογκογονιδίων και μορίων που ρυθμίζουν τις παραπάνω διαδικασίες [21]. Ανεξαρτήτως της αιτίας της ηπατικής δυσλειτουργίας, η καρκινογένεση και η εξέλιξη της νόσου περιλαμβάνει συνήθως τα παραπάνω χαρακτηριστικά (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Πιθανοί κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί ηπατοκαρκινογένεσης και εξέλιξης του HCC, ως αποτέλεσμα διαφόρων αρχικών αιτιολογικών παραγόντων. Σημειώνονται επιγραμματικά οι βασικοί μοριακοί παράγοντες που ρυθμίζουν αυτούς τους μηχανισμούς στο HCC [21]

Κατά το πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης μικρός αριθμός κυττάρων με χαρακτηριστικά βλαστικών κυττάρων έχουν τη δυνατότητα αυτοανανέωσης και δημιουργίας ετερογένειας στον όγκο, εξαιτίας της πολυδύναμης φύσης τους [21]. Η πρόοδος της νόσου υποβοηθάται από την αυξημένη αγγειογενετική δράση που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου. Ο σχηματισμός νέων αγγείων στην περιοχή του πρωτοπαθούς όγκου προάγει τη μεταστατική του ικανότητα, αυξάνοντας την πιθανότητα επέκτασης των καρκινικών κυττάρων μέσα στον αυλό αγγείων και την εξασφάλιση ιδανικών συνθηκών πορσφοράς αίματος στον όγκο. Η εξέλιξη του καρκίνου ενισχύεται και από την αναπτυσσόμενη υποξία και το προαναφερόμενο κίρρωτικό μικροπεριβάλλον, που ευνοεί το μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT) [20, 21, 24]. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες και άλλα μόρια που υποστηρίζουν τη νεοαγγειογένεση, αυξάνουν τοπικά την υπάρχουσα φλεγμονή, προάγουν την ανοσοκαταστολή και την αποφυγή της απόρριψης του όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα και δημιουργούν ένα πιο επιθετικό-διηθητικό φαινόμενο στα καρκινικά κύτταρα, ενισχύοντας την τάση τους για μετάσταση και διασπορά της νόσου.

Ωστόσο, επειδή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πρόκειται για έναν ετερογενή τύπο καρκίνου, η πορεία της νόσου περιλαμβάνει διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς και σηματοδοτικά μονοπάτια, ανάλογα με τον αρχικό αιτιολογικό παράγοντα της ηπατικής δυσλειτουργίας. Κυρίαρχο ρόλο μεταξύ των εμπλεκόμενων μοριακών παραγόντων κατέχουν διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια και πρωτο-ογκογονίδια που συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

Ο ρόλος των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι να παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Θεωρούνται «υπολειπόμενα», καθώς για την εμφάνιση μεταλλαγμένου φαινοτύπου απαιτείται η απώλεια λειτουργίας και των δύο αλληλόμορφων γονιδίων (αλληλίων). Στον κληρονομικό καρκίνο, κληρονομούμενες μεταλλάξεις προϋπάρχουν στο ένα αλληλίο και σωματικές μεταλλάξεις προκαλούνται στο δεύτερο. Κατά τη νεοπλασία σωματικών κυττάρων, είτε παρατηρείται απώλεια του ενός αλληλίου και το εναπομείναν εμφανίζει κάποια μετάλλαξη ή παρατηρείται απώλεια και των δύο αλληλίων [19].

Σε αντίθεση με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα πρωτο-ογκογονίδια ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση. Τα πρωτο-ογκογονίδια ενδέχεται να υπερεκφραστούν με ποικίλους τρόπους. Μετάλλαξη σε ένα εκ των δύο αλληλίων επαρκεί για να υποκινήσει την καρκινογένεση. Εναλλακτικά, το πρωτο-ογκογονίδιο μπορεί να πολλαπλασιαστεί ως προς τον αριθμό των αντιγράφων του και κατόπιν να υπερεκφραστεί. Η υπερέκφραση μπορεί, επίσης, να επέλθει ως αποτέλεσμα της εισαγωγής συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε περιοχές κοντά στο ογκογονίδιο ή λόγω χρωμοσωμικών αναδιατάξεων που μετατοπίζουν το πρωτο-ογκογονίδιο στην περιοχή ενός άλλου εκφραζόμενου γονιδίου [19].

Εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια

Οι διαταραχές της λειτουργίας των σηματοδοτικών μονοπατιών στον καρκίνο μπορούν να ταξινομηθούν με βάση έξι διαδικασίες των κυττάρων, κάποιες από τις οποίες πρέπει να τροποποιηθούν για την εξέλιξη του: αυτάρκεια σε σήματα κυτταρικής αύξησης, αντίσταση σε αντι-αυξητικά σήματα, αποφυγή απόπτωσης, απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής, συνεχής αγγειογένεση, καθώς και διήθηση και μετάσταση του όγκου [25]. Σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου (π.χ. του κόλου ή του μαστού), στον καρκίνο του ήπατος οι γονιδιακές μεταλλάξεις δεν είναι τόσο συχνό φαινόμενο [26]. Ειδικά όσον αφορά το ηπατοκαρκίνωμα, χαρακτηριστικό όλων των περιπτώσεων είναι η αποφυγή της απόπτωσης εξαιτίας της απορρύθμισης των ενδογενών και εξωγενών αποπτωτικών μονοπατιών [23]. Εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με την πάροδο του χρόνου έχουν υποδείξει έναν αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται και πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται και σχετίζονται με την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την μετανάστευση των κυττάρων [21, 27]. Επιπροσθέτως, στο συγκεκριμένο τύπο καρκίνου οι διαταραχές στην ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου αποδίδονται κυρίως σε σημειακές μεταλλάξεις του p53 ή απώλεια ετεροζυγωτίας, σίγαση του γονιδίου p16 ή γονιδίων ρετινοβλαστώματος ή υπερέκφραση της κυκλίνης D1 [23].



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μοριακής παθογένεσης του ηπατοκαρκινώματος. Η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που προωθούν τον όγκο είναι καθοριστικός παράγοντας για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του ήπατος. Αλλαγές που εντοπίζονται σε όλους τους όγκους αφορούν απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής λόγω ενεργοποίησης TERT, νεοαγγειογένεση (λόγω ενεργοποίησης VEGF, PDGF, αγγειοποιητίνης κλπ) και αντίσταση σε αντι-αυξητικά σήματα (εξαιτίας διαταραχών στα γονίδια p53, p21, Rb, cyclin D1) και απόπτωση [23]

Το p53 είναι ένα γονίδιο που παρέχει τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες για την σύνθεση της πρωτεΐνης p53, η οποία λειτουργεί ως καταστολέας όγκων που ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση, αποτρέποντας τα κύτταρα από το να πολλαπλασιαστούν πολύ γρήγορα ή κατά ανεξέλεγκτο τρόπο. Πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση και την διαφοροποίηση των κυττάρων [23]. Επειδή έχει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης, η απενεργοποίησή του συχνά συμπίπτει με υπερέκφραση ογκογονιδίων και μειωμένη έκφραση άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η απενεργοποίηση αυτή είναι από τα πιο συχνά φαινόμενα σε όγκους διαφόρων κυτταρικών προελεύσεων και αποτελεί χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των περιπτώσεων ηπατοκαρκινώματος που βασίζονται στην έκθεση σε αφλατοξίνη Β, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για την αλλαγή της γουανίνης του τρίτου νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 249 του p53 σε θυμίνη [19, 23, 26].

Άλλο κομβικό σημείο για την καρκινογένεση αποτελεί η ανώμαλη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού p16/cyclin D1/pRB ή μονοπατιού ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma, RB). Οι πρωτεΐνες p16, κυκλίνη D1 και pRB ρυθμίζουν το μηχανισμό δράσης του κυτταρικού κύκλου κατά τη φάση μετάπτωσης G1-S, δηλαδή κατά την προετοιμασία του κυττάρου για αντιγραφή και μάλιστα έχει διαπιστωθεί ότι οι p16 και pRB δρουν ως καταστολείς όγκων, ενώ η κυκλίνη D1 ως ογκογονίδιο. Στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα έχουν παρατηρηθεί διαταραχές στην έκφραση καθενός από τα τρία αυτά γονίδια, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με την υπερμεθυλίωση των υποκινητών τους [26, 28]. Γενικά, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών ενός γονιδίου τους καθιστά μεταγραφικά ανενεργούς και ενώ όταν συμβαίνει φυσιολογικά είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη, όταν γίνεται απορρυθμισμένα οδηγεί σε αναστολή της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Όσον αφορά τον καρκίνο του ήπατος, η δυσλειτουργία του προαναφερόμενου μονοπατιού οφείλεται στην υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου p16 (επίσης γνωστό και ως CDKN2A), που κωδικοποιεί έναν εξαρτώμενο από κυκλίνες αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών, η οποία ρυθμίζει το επίπεδο φωσφορυλίωσης του γονιδιακού προϊόντος RB1. Συνεπώς, η απώλεια της δράσης του p16 μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της φωσφορυλίωσης του RB1 και άρα αναστολή της ογκοκατασταλτικής του λειτουργίας [26].

Σημειώνεται ότι η ογκογένεση που προκύπτει από την απενεργοποίηση του p16 ή/και του pRB μπορεί να υποβοηθηθεί από την υπερέκφραση της κυκλίνης D1, που επίσης συμμετέχει στο μονοπάτι RB [28]. Η κυκλίνη D1 ανήκει στις κυκλίνες D, μια οικογένεια πρωτεϊνών που δρουν στη φάση G1-S του κυτταρικού κύκλου και οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται από

την παρουσία διαφόρων αυξητικών παραγόντων [29]. Ο ρόλος τους είναι να προσδένονται και κατ' επέκταση να ενεργοποιούν μέλη της οικογένειας των εξαρτώμενων από κυκλίνες πρωτεϊνικών κινασών (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs), ώστε να φωσφορυλιώσουν στη συνέχεια συγγενικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος [30]. Γενετικές ή επιγενετικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε υπερέκφραση της κυκλίνης D1 αποτελούν τη βάση πολλών ανθρώπινων νεοπλασιών και μπορεί να δημιουργήσουν ακόμα ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη όγκου στο ηπατοκαρκίνωμα [28-30].

Ένα ακόμη σηματοδοτικό μονοπάτι που έχει θεμελιώδη ρόλο στην καρκινογένεση στο ηπατοκαρκίνωμα είναι αυτό της Wnt/ β -catenin. Το συγκεκριμένο εξελικτικό μονοπάτι συμμετέχει στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της ομοιόστασης, της κινητικότητας, της διαφοροποίησης, της μορφολογίας και της απόπτωσης των κυττάρων. Διαταραχές στο μονοπάτι της Wnt/ β -catenin συνδέονται με το πρώιμο στάδιο ανάπτυξης ηπατοκαρκινώματος και άλλων τύπων ανθρώπινων καρκίνων και οφείλονται κυρίως σε μόλυνση από τους ιούς της ηπατίτιδας B και C, καθώς και στην αλκοολική κίρρωση του ήπατος. Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας (gain-of-function) στο πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β -catenin (στην πλειοψηφία των περιπτώσεων συσσωρευμένες στο τρίτο εξόνιο του γονιδίου, στα κωδικόνια 32-37, 41 και 45) παρεμποδίζουν την φωσφορυλίωση και την επερχόμενη αποδόμησή της και προάγουν την ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού, προκαλώντας μια φλεγμονώδη απόκριση [21, 26, 31]. Εκτός από την β -catenin, στον καρκίνο του ήπατος μεταλλάξεις εντοπίζονται και στους αρνητικούς ρυθμιστές Axin 1 και Axin 2 του Wnt μονοπατιού, η ενεργοποίηση του οποίου μπορεί να προκληθεί και από υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων APC (*Adenomatous polyposis coli*) και E-cadherin.[23, 31]

Σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται κατά την ηπατοκαρκινογένεση είναι και το σύνθετο μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK [26]. Οι πρωτεΐνες Ras (N-Ras, H-Ras, K-Ras) είναι μικρές πρωτεΐνες πρόσδεσης GTP (GTPάσες), που επίσης επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων και αποτελούν τα πιο μελετημένα πρωτο-ογκογονίδια στους ανθρώπινους καρκίνους [21, 26]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras ξεκινά κατά την πρόσδεση ενός προσδέτη στον υποδοχέα του στην κυτταρική μεμβράνη και επάγει την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης στο κυτταροπλασματικό τομέα του υποδοχέα [26]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα συνεπάγεται την ενεργοποίηση των Ras πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την πρόσδεση κινασών σερίνης-θρεονίνης (Raf πρωτεϊνών) και δίνοντας έναυσμα σε μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλίωσεων MEK (Methyl Ethyl Ketone) και ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) κινασών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [26, 31]. Οι κινάσες MEK και ERK που συμμετέχουν στο παραπάνω σύνθετο μονοπάτι ανήκουν στις ενεργοποιούμενες από μιτογόνα κινάσες MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPKs) που συμμετέχουν σε διάφορους μηχανισμούς που αφορούν την κυτταρική επιβίωση. Στο ηπατοκαρκίνωμα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK είναι αποτέλεσμα της δράσης ογκοπρωτεϊνών των ιών HBV και HCV, ενώ η ενεργοποίηση του σύνθετου Ras/Raf/MEK/ERK οφείλεται σε ανώμαλα σήματα των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων ανάντη (upstream) του σηματοδοτικού μονοπατιού ή υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. του NORE1A) [23, 31].

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR έχει, επίσης, καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση. Η Akt, ή πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B, PKB), είναι μια κινάση σερίνης-θρεονίνης που λειτουργεί ως ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Θεωρείται ότι συμμετέχει σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες (π.χ. επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF, ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας IGF) και άλλα εξωκυττάρια

ερεθίσματα, για να ρυθμίσει ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων είναι ο μεταβολισμός, η κυτταρική αύξηση και η απόπτωση. Εκτός από τα ενισχυμένα ερεθίσματα των αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, που είναι υπερεκφρασμένοι σε περιπτώσεις κίρρωσης και γενικά σε περιπτώσεις ηπατοκαρκινώματος, υπαίτια για την ενεργοποίηση της Akt είναι η ενεργοποίηση της κινάσης PI3K (phosphatidylinositide-3-kinase), που προκαλεί φωσφορυλίωση της Akt, και η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του συγκεκριμένου μονοπατιού, λόγω επιγενετικής σίγασης ή σωματικών μεταλλάξεων. Άλλοι σημαντικοί μεσολαβητές του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR είναι ο mTOR (κύριος ρυθμιστής της κυτταρικής αύξησης, μέσω ελέγχου της μετάβασης G1/S) και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και τα προαποπτωτικά αντίστοιχά τους (Bad, Bid, Bik, Bax, Bak), που ρυθμίζουν το αποπτωτικό πρόγραμμα των κυττάρων. Φωσφορυλίωση των παραπάνω μεσολαβητών αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση, συνεισφέροντας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [23, 32].

Φλεγμονή

Η φλεγμονώδης διαδικασία στο ήπαρ χαρακτηρίζεται από μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων σε περιοχές που έχουν προσβληθεί από κάποιον επιβλαβή παράγοντα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική (π.χ. φυσικοί φονείς – natural killer cells, μακροφάγα) και στην επίκτητη ανοσία (π.χ. T και B λεμφοκύτταρα) και ασκούν τόσο ευεργετική (π.χ. απομόνωση παθογόνων, ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης), όσο και επιβλαβή δράση (π.χ. ηπατοκυτταρική νέκρωση) [33, 34]. Η μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων, που επάγεται από την έκκριση χημειοκινών στην περιοχή του τραύματος, καθορίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονωδών κυττάρων και «παθολογικών» κυττάρων της περιοχής, αρχικά ενδοθηλιακών κυττάρων και εν συνεχεία αστεροειδών κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την έκλυση χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή, τοπικοί ιστικοί παράγοντες από τα «παθολογικά» ηπατοκύτταρα και την αποδομημένη εξωκυττάρια ουσία διεγείρουν την έκφραση διαφόρων κυτοκινών και χημειοκινών, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τη φλεγμονώδη απόκριση. Η προαναφερθείσα αλληλεπίδραση ενδεχομένως να οδηγήσει σε νέκρωση των ηπατοκυττάρων [33, 35].

Χρόνιες λοιμώξεις και φλεγμονή του ήπατος οδηγούν σε διαρκή κυτταρικό θάνατο και συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό κατά την εξέλιξη του καρκίνου συνοδεύεται από παραγωγή μεγάλου αριθμού κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων που ευνοούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου παραγόμενες τόσο από κύτταρα που εκφράζουν ογκογονίδια, όσο και από φλεγμονώδη κύτταρα, προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στο DNA των ηπατοκυττάρων, οδηγώντας σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή/και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και πρόκληση ποικίλων επιγενετικών αλλαγών που ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου [34]. Ο κύριος τρόπος μετάδοσης και έκφρασης των περισσότερων μεσολαβητών της φλεγμονής είναι μέσω του πυρηνικού παράγοντα κB (Nuclear Factor κB, NFκB) και του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3).

Ο NFκB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που απαντάται σε όλα τα κύτταρα και και αποτελεί σημαντικό μεσάζοντα της φλεγμονώδους ανοσοαπόκρισης των κυττάρων, κυρίως μέσω της ρύθμισης της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών. Επιπροσθέτως, έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Εφτά διακριτές πρωτεΐνες της οικογένειας Rel (NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB and c-Rel κ.α.) σχηματίζουν διμερή του NF-κB, που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή, συνδεδεσμένα με την πρωτεΐνη αναστολέα IκB. Ως αποτέλεσμα σηματοδότησης, ελεύθερα μόρια NF-κB ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης και συσσωρεύονται στον πυρήνα, όπου μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στις

παραπάνω διαδικασίες [34, 36, 37]. Από μηχανιστική σκοπιά, η ευνοϊκή για την εξέλιξη του καρκινικού όγκου δράση του NFκB μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητά του να εμποδίσει την απόπτωση, καθώς μεταξύ των γονιδίων-στόχων του συγκεκριμένου μορίου εντοπίζονται σημαντικοί αναστολείς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης (Inhibitors of Apoptosis, IAPs), καθώς και αντιοξειδωτικά γονίδια, όπως το υπεροξειδίο της δισμουτάσης του μαγγανίου. Η ενεργοποίηση των παραπάνω NFκB-εξαρτώμενων γονιδίων σε προνεοπλαστικά κύτταρα επιτρέπει στα κύτταρα αυτά να διαφύγουν την εξόντωσή τους από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς, ευνοώντας την εξέλιξη της νεοπλασίας. Επιπροσθέτως, ο NFκB προωθεί την επιθυλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), κατά την οποία πραγματοποιείται αλλαγή του φαινοτύπου των κυττάρων και απόκτηση διεισδυτικών και μεταστατικών ιδιοτήτων. Ρυθμίζοντας την έκφραση καθοριστικών για την EMT γονιδίων (π.χ. E-καντχερίνη, μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας), ενισχύει την μεταστατική συμπεριφορά του όγκου [31],[32]. Τέλος, από τη δραστηριότητα του NFκB στα φλεγμονώδη κύτταρα προωθείται και ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων, ο οποίος, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του όγκου [38].

Άλλος ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση, τη φλεγμονή και την ογκογένεση είναι η πρωτεΐνη STAT-3. Γενικά, η πρωτεΐνη STAT-3 ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών με ρόλο μεταγωγέων σημάτων και ενεργοποιητών μεταγραφής, STAT. Σε μη ερεθισμένα κύτταρα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι σε λανθάνουσα μορφή, αλλά ενεργοποιείται ταχύτατα παρουσία κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), μέσω υποδοχέων κυτοκινών που σχετίζονται με μέλη της οικογένειας των Janus κινάσων (Janus Kinases, JAKs). Επιπλέον, ενεργοποιείται και μέσω υποδοχέων αυξητικών παραγόντων που διαθέτουν ενδογενή δράση τυροσινικής κινάσης, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) και ο υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR) [34, 38]. Η ενεργοποίηση της STAT-3 απαιτεί φωσφορύλιωση τυροσινικών της υπολειμμάτων, που ακολουθείται από διμερισμό της πρωτεΐνης και μεταφορά στον πυρήνα για την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων [34].

Ο ρόλος της STAT-3 αναφορικά με τη φλεγμονή και τον καρκίνο είναι σύνθετος. Καταρχάς, η ενεργοποίησή της παρατηρείται τόσο σε κύτταρα του όγκου, όσο και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Στα ανοσοκύτταρα η δράση της παρεμποδίζει την έκφραση απαραίτητων μεσολαβητών για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης στον όγκο και προωθεί την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, περιορίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ανοσιακή απόρριψη του όγκου [39]. Όσον αφορά τα κύτταρα του όγκου, η ενεργοποίηση της STAT-3 ενισχύει την επιβίωσή τους, καθώς αυξάνει την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-xL και κυκλίνες D1 και E1), και προωθεί την παραγωγή κυτοκινών (ιντερλευκινών 6 και 10) και αυξητικών παραγόντων (VEGF), προκαλώντας βλάβες στην ωρίμαση και την ανοσολογική δράση των δένδριτικών κυττάρων (Dendritic Cells, DCs) και των φυσικών φονέων (Natural Killer Cells, NK cells) [38].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των παραγόντων NFκB και STAT-3 παρατηρείται μια αλληλεπίδραση. Πιο αναλυτικά, ο NFκB καταλήγει στην έκφραση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η IL-6, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τη σηματοδότηση της STAT-3. Από την άλλη, πολλά γονίδια-στόχοι του NFκB που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου ρυθμίζονται, επίσης, από τη STAT-3 (Bcl-xL, VEGF, MMP9 κ.α.), υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση της STAT-3 ενδεχομένως ευθύνεται για την ενεργοποίηση του NFκB σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός δε φαίνεται να επικρατεί στις περισσότερες περιπτώσεις ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος, αφού η πλειοψηφία των όγκων με ενεργοποιημένη STAT-3 δεν εμφανίζει ενεργοποιημένο NFκB [34, 38].

Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη κάθε συμπαγούς όγκου, που είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος των 2-3 mm². Ειδικά όσον αφορά το ηπατοκαρκίνωμα, η αγγειογένεση είναι ζωτικής σημασίας, καθώς πρόκειται για έναν αγγειοβριθή όγκο, του οποίου το αγγειακό δίκτυο είναι μοναδικό και διαφορετικό από αυτό του περιφερειακού ηπατικού παρεγχύματος [19, 40]. Πράγματι, διαταραχές στην αγγειογένεση παρατηρούνται ήδη από τα πρώτα στάδια της ηπατοκαρκινογένεσης, ως αποτέλεσμα αυτοκρινικής/παρακρινικής έκκρισης ποικίλων αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων [23]. Από τους διάφορους αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες, ο πιο απαραίτητος και βασικός για την προώθηση της αγγειακής ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [19]. Η υπερέκφραση του VEGF είναι συχνό φαινόμενο σε υπόβαθρο κίρρωσης και χρόνιας φλεγμονής του ήπατος (όπως κατά τη χρόνια λοίμωξη με ηπατίτιδα C) και τα αυξημένα επίπεδα του VEGF και των αντίστοιχων υποδοχέων του που παρατηρούνται τόσο στον ιστό όσο και στον ορό του αίματος στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα συνδέονται με αυξημένη επιθετική συμπεριφορά του όγκου [19, 40]. Ο VEGF μπορεί να δρα σαν παρακρινικός αυξητικός παράγοντας στα αγγεία και σαν αυτοκρινικός αυξητικός παράγοντας που υποβοηθά τον πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς του (VEGFRs). Η έκφρασή του επηρεάζεται από την υποξία και την οξειδωση των ιστών και των οργάνων, από διάφορες ορμόνες, κυτοκίνες, μόρια που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. NO, MAPKs), καθώς και από μεταλλάξεις ογκογονιδίων [40].

Εκτός, όμως, από τον VEGFR, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μια πληθώρα υποδοχέων αγγειογενετικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων είναι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), η αγγειοποιητίνη-2, ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factors a and b, TGF-a, TGF-b) και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας II (Insulin-like Growth Factor II, IGF-II) [19, 23]. Η αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους επηρεάζει αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα και τη διήθηση των κυττάρων. Η υπερέκφραση των παραπάνω αυξητικών παραγόντων και υποδοχέων που παρατηρείται στο ηπατοκαρκίνωμα οδηγεί σε αυξημένη αγγειογενετική δράση και μεγαλύτερη αντίσταση σε αναστολή αυτής [21].

Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων έχει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Extracellular Matrix, ECM) αποτελείται από ένα τρισδιάστατο σύνθετο δίκτυο μακρομορίων (πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και πολυσακχαρίτες) με διάφορες φυσικές, βιοχημικές και μηχανικές ιδιότητες. Δομικά, τα συστατικά αυτά συντάσσουν τόσο την βασική ηπατική μεμβράνη, που αποτελείται από επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα, όσο και την ενδιάμεση εξωκυττάρια ουσία, που αποτελείται κυρίως από στρωματικά κύτταρα. Η βασική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από λαμίνες που παρέχουν σημεία πρόσφυσης επιθηλιακών κυττάρων, κολλαγόνο τύπου IV που σταθεροποιεί τη συνολική δομή, ινονεκτίνη και συνδετικές πρωτεΐνες που ενώνουν το κολλαγόνο με τα λοιπά πρωτεϊνικά συστατικά. Ο κύριος ρόλος της είναι να παρέχει μηχανική στήριξη στα ηπατοκύτταρα και να επιτρέπει τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και αυξητικών παραγόντων προς αυτά. Σε αντίθεση με τη βασική μεμβράνη, η εξωκυττάρια ουσία του ενδιάμεσου χώρου (εντοπίζεται στην ηπατική κάψα, στους περιαγγειακούς χώρους και τις πυλαίες τριάδες) αποτελείται από ινίδια κολλαγόνου (τύπου I, III), πρωτεογλυκάνες και ποικίλες γλυκοπρωτεΐνες [41-43].

Στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα η διατήρηση της ECM δεν είναι σταθερή, αλλά αφορά μια δυναμική διαδικασία σύνθεσης νέας ECM και αποδόμησης της προϋπάρχουσας. Η διαρκής αναδιαμόρφωση της ECM πραγματοποιείται με τη δράση διαφόρων ενζύμων αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας, τόσο υπό φυσιολογικές, όσο και υπό παθολογικές συνθήκες [41]. Σε παθολογικές συνθήκες, η ECM παρέχει ένα φυσικό ικρίωμα πάνω στο οποίο προσκολλώνται τα καρκινικά κύτταρα και μεταναστεύουν και είναι σημαντική για τη ρύθμιση διαδικασιών όπως η κινητικότητα, ο πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η μετάσταση των κυττάρων [42]. Αλλαγές στη σύσταση της ECM και την αλληλεπίδρασή της με τα κύτταρα θεωρούνται καθοριστικές για την έναρξη των καρκινικών διαδικασιών, καθώς οι αλλαγές στην παραγωγή και την έκφραση των μορίων της ECM επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων του στρώματος (ενδοθηλιακά, ανοσοκύτταρα, ινοβλάστες), προωθώντας την αγγειογένεση και τη φλεγμονή και δημιουργώντας ένα καρκινικό περιβάλλον, το οποίο οδηγεί σε μεταστάσεις.

Τα κυριότερα ένζυμα κατά την αναδιαμόρφωση της ECM είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Matrix Metalloproteinases - MMPs), που είναι ενδοπεπτιδάσες των οποίων τα μόρια ιστιδίνης συνδέονται με ψευδάργυρο στο καταλυτικό κέντρο [41]. Οι MMPs συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της επούλωσης πληγών και της οργανογένεσης, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η φλεγμονή, η ηπατική βλάβη, η ινωδογένεση και η καρκινογένεση [44, 45]. Όντας ικανές να αποικοδομούν τα συστατικά της ECM, συμμετέχουν στην απώλεια των δομών συνοχής του κυττάρου, συνεισφέροντας στη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [46]. Εκτός από την αποικοδομητική τους δράση, οι MMPs εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και ορμονών στην εξωκυττάρια ουσία, ενώ ρυθμίζουν και την αλληλεπίδραση της τελευταίας με τα γύρω κύτταρα [41]. Σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα και η δράση τους ελέγχεται αυστηρά, ώστε να περιορίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές της ECM και αναστέλλεται από ειδικούς ιστικούς αναστολείς των MMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs). Η διατήρηση της εξωκυττάριας ουσίας στο ήπαρ οφείλεται στην αρμονική ισορροπία μεταξύ πρωτεϊνών και των αναστολέων αυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης (EGFR, IGFR) ή υποδοχέων οιστρογόνων διαταράσσει την πρωτεολυτική ισορροπία (έκφραση και δραστηριότητα) των πρωτεϊνών [41].

Μια άλλη ψευδαργυρο-εξαρτώμενη οικογένεια πρωτεϊνών, συγγενής με τις MMPs, είναι οι ενδοπεπτιδάσες ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinases). Οι ADAMs χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: τις ADAMs πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη (membrane-bound ADAMs) και τις εκκρινόμενες ADAMTSs (A Disintegrin and Metalloproteinases with Thrombospondin), που χαρακτηρίζονται από μοτίβα κυτταρικής αποκόλλησης/πρόσφυσης και σύντηξης [41, 45]. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο οι ADAMs, όσο και οι ADAMTSs εμφανίζουν τροποποιημένα επίπεδα έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκινικών όγκων, υποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια της εξέλιξης του καρκίνου κατά την καρκινογένεση. Μόρια ADAM επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μετανάστευση και τη σηματοδότηση των καρκινικών κυττάρων, κυρίως μέσω της πρόσδεσης σε μόρια των υποδοχέων πρόσφυσης των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία και αλληλεπιδρώντας με θέσεις φωσφορυλίωσης για κινάσες σερίνης και σερίνης/ θρεονίνης. Επιπλέον, όπως και οι MMPs, διαθέτουν αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες στην εξωκυττάρια ουσία και αλληλεπιδρούν με μακρομόρια της (κολλαγόνο, ελαστίνη, υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης κ.α.), οδηγώντας στη σύνθεση βιοενεργών μορίων (ματρικίνες-matrilines) που συμμετέχουν στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την απόπτωση των κυττάρων, καθώς και την παραγωγή πρωτεασών [41, 45, 47].

Επανενεργοποίηση της ανάστροφης τρανσκριπτάσης της τελομεράσης

Η γενωμική αστάθεια είναι χαρακτηριστικό των περισσότερων καρκινικών κυττάρων και αφορά την αυξημένη τάση για γενωμικές αλλαγές κατά την κυτταρική διαίρεση, προδιαθέτοντας τα κύτταρα για κακοηθείς μετασχηματισμούς [48]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ακόμη και όταν ένα κύτταρο υποστεί γενετικές αλλοιώσεις, το φαινόμενο της αναπαραγωγικής γήρανσης, που μειώνει το μέγεθος των τελομερών που «προστατεύουν» τη χρήσιμη γενετική πληροφορία των χρωμοσωμάτων, επιτρέπει τον πεπερασμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και, συνεπώς, προφυλάσσει από την καρκινογένεση.

Το φαινόμενο της γενωμικής αστάθειας συνδέεται με τη μείωση του μήκους των τελομερών, την ανώμαλη μεθυλίωση και τις βλάβες στα επιδιορθωτικά γονίδια του DNA. Σχεδόν στο 90% των περιπτώσεων ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος παρατηρείται επανέκφραση και αυξημένη δράση της τελομεράσης, ενός ενζυματικού συμπλόκου που αποτελείται από μια πρωτεϊνική υπομονάδα (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) και μια RNA υπομονάδα (Telomerase RNA Component, TERC) και συμμετέχει στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των τελομερών [49]. Η γενωμική αστάθεια προκύπτει είτε από ενσωμάτωση του HBV στη θέση της ανάστροφης τρανσκριπτάσης της τελομεράσης (TERT) στο γονιδίωμα του ξενιστή, είτε από ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την RNA υπομονάδα του ενζύμου (TERC) ή από απώλεια αλληλίου του χρωμοσώματος 10p, που ανήκει σε μια περιοχή που κωδικοποιεί έναν αναστολέα της τελομεράσης. Η επανενεργοποίηση της TERT και γενικά της τελομεράσης εξασφαλίζει στα καρκινικά κύτταρα απεριόριστη ικανότητα αντιγραφής [23].

3. Φυσικές ενώσεις και φαρμακοτρόφιμα

Φαρμακοτρόφιμα

Ο όρος «φαρμακοτρόφιμο» (neutraceutical < nutrient + pharmaceutical) επινοήθηκε το 1989 και αποδίδεται στον Stephen DeFelice. Περιλαμβάνει κάθε τρόφιμο ή συστατικό του, το οποίο εκτός από τη διατροφή συνεισφέρει και στην υγεία του ανθρώπου, μεταξύ άλλων με την πρόληψη και τη θεραπεία κακοηθειών. Επιπλέον, αποτελούν συνήθη τρόφιμα στα πλαίσια μιας διατροφής ή και τα αποκλειστικά συστατικά ενός γεύματος [50]. Τα φαρμακοτρόφιμα που προέρχονται από φυτικές πηγές (φυτοσύμπλοκα – phytocomplex) ή ανήκουν σε ενεργό μεταβολικό σύμπλοκο (αν πρόκειται για ζωικής προέλευσης), περιέχουν ένα σύνολο φαρμακολογικά ενεργών ουσιών με εγγενείς θεραπευτικές ιδιότητες χάρη στα φυσικά συστατικά που περιέχουν. Η κατανάλωσή τους γίνεται στην κατάλληλη φαρμακευτική μορφή (π.χ. κάψουλα, ταμπλέτα κλπ.), η οποία συμπίπτει τόσο με αυτή των φαρμάκων, όσο και με των συμπληρωμάτων διατροφής [51]. Ωστόσο, τα φαρμακοτρόφιμα δεν πρέπει να συγχέονται με τα συμπληρώματα διατροφής.

Σύμφωνα με το DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act of 1994) ως «συμπληρώματα διατροφής» ορίζονται προϊόντα (εκτός του καπνού) τα οποία προορίζονται ως συμπληρώματα της συνήθους δίαιτας και περιέχουν ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα συστατικά: βιταμίνες, μέταλλα, αμινοξέα και γενικά κάποιο θρεπτικό συστατικό που προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, ώστε να αυξήσει τη συνολική ημερήσια ποσότητα πρόσληψής τους. Τα συμπληρώματα διατροφής φέρουν την αντίστοιχη ετικέτα, προσλαμβάνονται σε μορφή χαπιού, κάψουλας, ταμπλέτας ή σε υγρή μορφή και δεν αποτελούν υποκατάστατα γεύματος [52].

Συνεπώς, βάσει ορισμού, τα φαρμακοτρόφιμα διαφέρουν από τα συμπληρώματα διατροφής στα εξής δύο σημεία:

1. Τα φαρμακοτρόφιμα δεν επαρκεί να παρέχουν επιπλέον θρεπτικά συστατικά στη συνήθη διαίτα, αλλά πρέπει και να συνεισφέρουν στην πρόληψη ή/και την αντιμετώπιση ασθενειών ή/και διαταραχών.
2. Τα φαρμακοτρόφιμα συνιστανται για χρήση ως συστατικά γεύματος ή ως αποκλειστικά γεύματα [50, 52].

Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα είναι χημικές ενώσεις ή ουσίες που λαμβάνονται από φυσικές πηγές, όπως φυτά, ζώα ή μικροοργανισμοί [53]. Χάρη στην πληθώρα ουσιών που περιέχουν, τα φυσικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στους τομείς της ιατρικής, της φαρμακολογίας και της βιολογίας ανά τους αιώνες. Περισσότερα από τα μισά διαθέσιμα φάρμακα είναι φυσικά προϊόντα ή σχετίζονται με αυτά και ειδικά στην περίπτωση του καρκίνου, το ποσοστό αυτό ξεπερνά το 60%, με νέα φάρμακα που προέρχονται από φυσικές πηγές με τροποποίηση της δομής φυσικών προϊόντων ή με σύνθεση ουσιών χρησιμοποιώντας τα φυσικά προϊόντα ως πρότυπα. Κατ' αυτό τον τρόπο, πολλές ενώσεις που απομονώνονται από φυτά, θαλάσσια χλωρίδα και μικροοργανισμούς χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για την παραγωγή μοριακά τροποποιημένων δομικών αναλόγων με βελτιωμένη φαρμακολογική δράση και μειωμένες παρενέργειες [54].

Φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην αξιοποίηση φυτικών προϊόντων, τα οποία κυριαρχούν στην ανθρώπινη φαρμακολογία εδώ και χιλιάδες χρόνια, παρέχοντας μια ανεξάντλητη πηγή φαρμάκων για τη θεραπεία ασθενειών και τη διατήρηση της υγείας. Τα πλεονεκτήματα των φυτικών προϊόντων που συγκεντρώνουν φαρμακολογικό ενδιαφέρον συνοψίζονται στις παρακάτω ιδιότητες:

❖ Σύνθετη σύσταση

Τα συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων έχουν πολλαπλές ιδιότητες που οδηγούν σε μεγαλύτερη συνολική δραστηριότητα. Πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού περιλαμβάνει τη συνέργεια, την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και τα σωρευτικά αποτελέσματα [55].

❖ Φυσική συνέργεια

Οι ταχύτεροι ρυθμοί με τους οποίους τα διάφορα παθογόνα και καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ανθεκτικότητα σε φάρμακα που στηρίζονται σε μεμονωμένα συστατικά έστρεψε το ενδιαφέρον της σύγχρονης έρευνας στην ανάπτυξη θεραπειών πολλαπλών στόχων [55, 56]. Στηριζόμενα σε συνδυασμούς πλειοτροπικών μορίων, τα φυτά έχουν καταφέρει να δημιουργήσουν δραστικά φυτοχημικά σύμπλοκα για την επίτευξη πολλών συμπληρωματικών λειτουργιών. Τα φυσικά προϊόντα διαφέρουν σημαντικά από τα συνθετικά φάρμακα ως προς τη συχνότητα εμφάνισης ελευθέρων ριζών και τη χωροταξική διαμόρφωση. Ακόμα, περιέχουν λιγότερο άζωτο, φώσφορο, θείο και αλογόνα, ενώ εμφανίζουν συνολικά μεγαλύτερη μοριακή πολυπλοκότητα, ποικιλία ικριωμάτων, στερεοχημικών δομών και συστημάτων δακτυλίων και επιπλέον έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν ή να αναστέλλουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, τα φυσικά προϊόντα είναι αποτελεσματικοί ρυθμιστές πολλών κυτταρικών διαδικασιών (π.χ. ανοσολογική απόκριση, κυτταρική σηματοδότηση, μίτωση, απόπτωση) και η φαρμακολογική τους δράση αποδίδεται κυρίως στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους, ο οποίος παρουσιάζεται εκτενέστερα στη συνέχεια. Παρ' όλο που η δράση των περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ένα σημαντικό ποσοστό αυτών κατέχει καθοριστικό ρόλο στην άμυνα και τη σηματοδότηση τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε οργανικό επίπεδο. Συνέπως, η συνδυαστική τους χρήση είναι ενδεχομένως περισσότερο βιοδραστική απ' ό,τι η χρήση μεμονωμένων ενώσεων ή τυχαίων συνδυασμών αυτών [55].

❖ Συνέργεια μεταξύ φυσικών προϊόντων και συνθετικών ουσιών

Εκτενείς έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία 23 χρόνια υποδεικνύουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ουσιών των φυτικών προϊόντων αυξάνει την ανασταλτική δράση των εμπορικά διαθέσιμων αντιβιοτικών στην ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν την ενισχυμένη δράση αντιβιοτικών σε περιπτώσεις συνδυασμού τους με φυτικά αιθανολικά εκχυλίσματα του φυτού *Mangifera indica* (το ευρέως γνωστό μάνγκο). Ακόμα, πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν συνεργιστική δράση και με τα κύρια διαθέσιμα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [55].

Ένα πεδίο μεγάλου ενδιαφέροντος στο οποίο διερευνάται η χρήση προϊόντων φυτικής προέλευσης είναι αυτό της επιγενετικής επίδρασης της διατροφής. Η επιγενετική αφορά τον κλάδο της βιολογίας που μελετά τις αναστρέψιμες κληρονομικές αλλαγές στη λειτουργία των γονιδίων, που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και τον κυτταρικό

φαινότυπο μέσω μηχανισμών που αφορούν τη διάταξη και την έκφραση του πυρηνικού DNA, χωρίς να επιφέρουν κάποια αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του, όπως οι γενετικές μεταλλάξεις. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών και ανταποκρίνονται σε διάφορα ενδογενή και εξωτερικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η διατροφή, η ακτινοβολία και η έκθεση σε χημικά, τοξίνες και ορμόνες. Επιπροσθέτως, οι επιγενετικές τροποποιήσεις εμπλέκονται σε αρκετές παθολογίες, όπως π.χ. του καρκίνου, της νόσου Alzheimer και άλλων νευρολογικών διαταραχών. Η επιγενετική θεραπεία με διατροφικά προϊόντα φυτικής προέλευσης είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την καταπολέμηση του καρκίνου σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Τα πιθανά οφέλη των φυτικών προϊόντων ενδεχομένως αποδίδονται στην ικανότητά τους να στοχεύουν τους επιγενετικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με διάφορους τρόπους, όπως με αλλαγές στα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA και στην έκφραση των miRNAs [57].

Χαρακτηριστικές ενώσεις προϊόντων φυτικής προέλευσης

Η βιοσύνθεση και η διάσπαση πρωτεϊνών, λιπιδίων, νουκλεοτιδίων, οργανικών οξέων και υδατανθράκων αποτελεί τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτικών (και ζωικών) κυττάρων και οι ενώσεις που συμμετέχουν σε αυτόν ονομάζονται πρωτογενείς μεταβολίτες. Ο πρωτογενής μεταβολισμός αφορά τη μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση των απαραίτητων συστατικών τα οποία συγκροτούν τη θεμελιώδη δομή των φυτικών κυττάρων (π.χ. αναπνοή, σύνθεση πρωτεϊνών κ.ά.) και είναι παρών σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού [58, 59].

Έκτός, όμως, από τους πρωτογενείς μεταβολίτες, οι οργανισμοί παράγουν ένα μεγάλο αριθμό οργανικών μορίων, η σύνθεση των οποίων δε σχετίζεται ευθέως με τις ανάγκες αύξησης, ανάπτυξης και αναπαραγωγής των κυττάρων. Η μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεταβολικών προϊόντων, τα οποία παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς ή όργανα ή/και σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης αποτελεί το δευτερογενή μεταβολισμό. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται είτε κατά την προσπάθεια του οργανισμού να προσαρμοστεί στις συνθήκες του περιβάλλοντός του ή ως πιθανός αμυντικός μηχανισμός έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων με στόχο την επιβίωσή του. Έπειδή οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν καθοριστικό ρόλο στις οικολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού και περιβάλλοντος και, παρ' όλο που αποτελούν μικρό ποσοστό (10%) του συνολικού μεταβολισμού, είναι τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση, έχει επικρατήσει στις μέρες μας ο όρος «φυσικά προϊόντα» να αναφέρεται στα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού [59, 60].

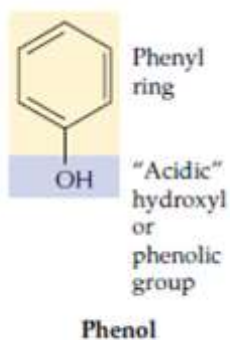
Ανάλογα με τη βιοσυνθετική οδό μέσω της οποίας παράγονται και τα χαρακτηριστικά του μορίου τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- ❖ Τερπενοειδή,
- ❖ Αλκαλοειδή και
- ❖ Πολυφαινολικές ενώσεις [59].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η προσοχή εστιάζεται στην ομάδα των πολυφαινολικών ενώσεων.

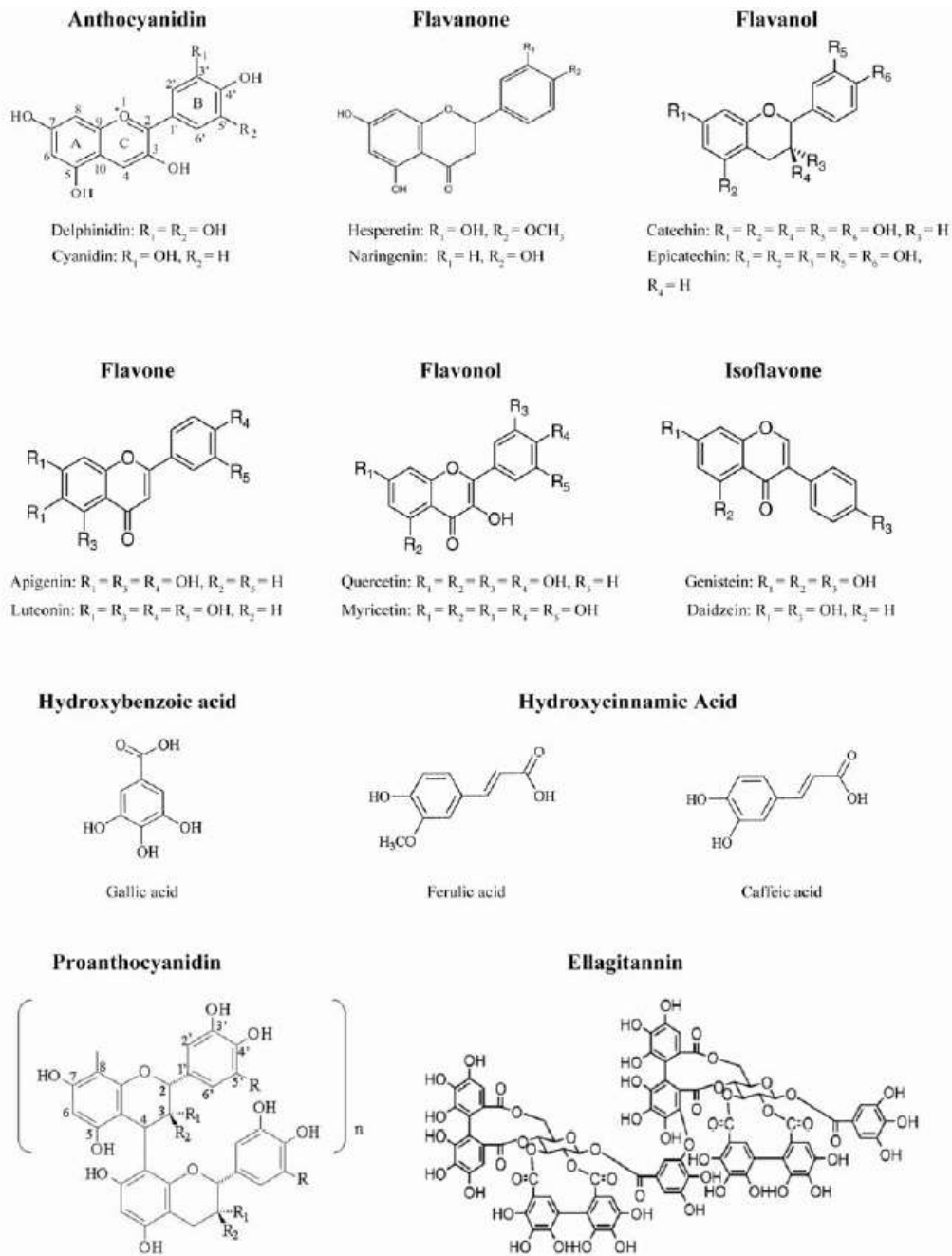
Πολυφαινολικές ενώσεις

Πολυφαινολικές ενώσεις γενικά χαρακτηρίζονται οι αρωματικές αλκοόλες που διαθέτουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίων (Εικόνα 4) [59, 61]. Πρόκειται για ενώσεις ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, οι οποίες αποτελούν τον πιο άφθονο δευτερογενή μεταβολίτη των φυτών, με περισσότερες από 8.000 φαινολικές δομές, που ποικίλουν από απλά μόρια (π.χ. φαινολικά οξέα) ως πολυμερισμένες ενώσεις (π.χ. τανίνες) [62].



Εικόνα 4. Απλούστερη δομή φαινόλης [59]

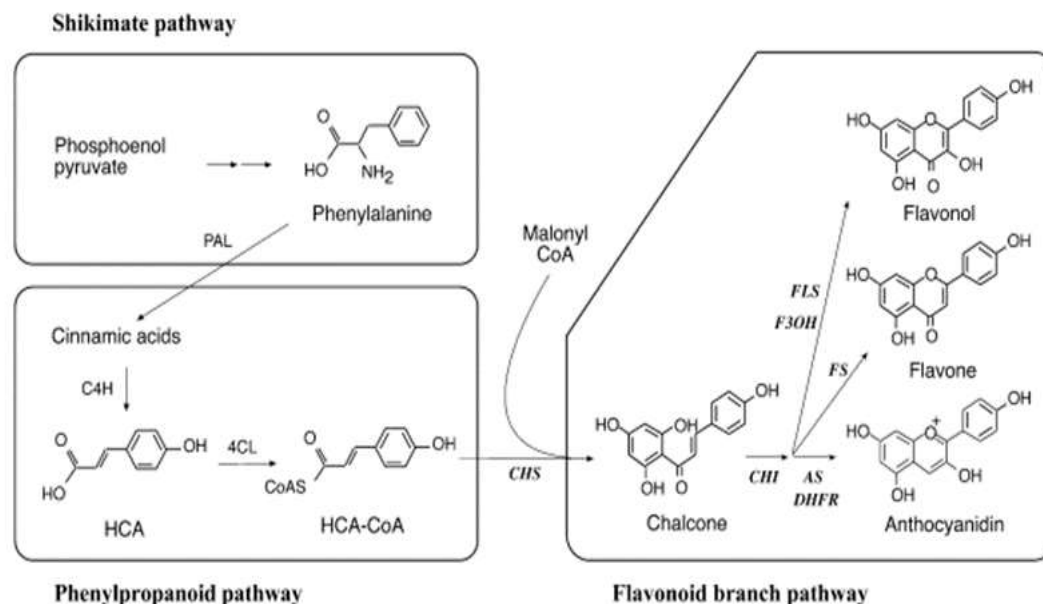
Οι φυτικές φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τα флаβονοειδή (πιο συχνά εμφανιζόμενα στη διατροφή του ανθρώπου), τις τανίνες και τις πιο σπάνιες ενώσεις στιλβένια και λιγνάνες. Από τις ενώσεις αυτές, τα флаβονοειδή χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες (φλαβόνες, флаβονόλες, флаβανόλες, флаβανόνες, ισοφλαβανόνες και ανθοκυανίνες), και τα φαινολικά οξέα σε δύο υποκατηγορίες (παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και παράγωγα του κινναμωνικού οξέος). Επιπλέον, οι τανίνες διακρίνονται σε υδρολυόμενες τανίνες, που φέρουν ένα μόριο σακχάρου (π.χ. γλυκόζη) εστεροποιημένο με μόρια γαλλικού οξέος (γαλλοτανίνες) ή ελλαγικού οξέος (ελλαγιτανίνες), και συμπυκνωμένες τανίνες, που είναι ολιγομερή ή πολυμερή αποτελούμενα από флаβαν-3-άλες. Επειδή μετά από κατεργασία τους με ισχυρά οξέα οι τανίνες υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, ονομάζονται, επίσης, και προανθοκυανιδίνες [62].



Εικόνα 5. Δομή φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και τανινών [62]

Η βιοσύνθεση των φυτοφαινολών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της βιοχημικής οδού του σικιμικού οξέος, που οδηγεί απευθείας σε φαινυλοπροπανοειδή (υδροξυκινναμωνικά οξέα, φαινυλοπροπένια, κουμαρίνες), ή μέσω του «πολυκετιδικού» οξικού/μαλονικού μονοπατιού, που μπορεί να συνθέσει και απλές φαινόλες. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, η οδός του σικιμικού οξέος αρχίζει με την παραγωγή φαινυλαλανίνης, η οποία μέσω της δράσης του ενζύμου λύαση της φαινυλαλανινικής αμιμονίας (Phenylalanine Ammonia - Lyase, PAL) οδηγεί στην παραγωγή κινναμικών οξέων. Τα παραγόμενα κινναμικά οξέα μετασχηματίζονται σε υδροξυκινναμικά οξέα με τη δράση της υδροξυλάσης C4H (Cinnamate-4-Hydroxylase, C4H) και μιας ο-μεθυλοτρανσφεράσης. Στη συνέχεια, το ένζυμο 4:κουμαράση:CoA λγάση (4-coumarate:CoA ligase, ACL) καταλύει το σχηματισμό του δραστικού ενδιάμεσου HCA-CoA (hydroxycinnamoyl CoA), το οποίο με τη σειρά του

χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών, μέσω της καταλυόμενης από τη συνθάση της χαλκόνης (Chalcone Synthase, CHS) συμπύκνωσής του με τρία μόρια Malonyl-CoA. Τέλος, η χαλκόνη μετατρέπεται σε διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών, μεταξύ των οποίων είναι και οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανιδίνες [63].



Εικόνα 6. Βιοσύνθεση φυτοφαινόλων. Επεξηγούνται οι συντομογραφίες CH: chalcone isomerase, F3OH: flavanone 3-hydroxylase, ISF: isoflavone synthase, FS: flavone synthase, FLS: flavonol synthase, DHFR: dihydroflavonol reductase, AS: anthocyanin synthase [64]

Από τα προαναφερόμενα βιοχημικά μονοπάτια παράγεται ένας μεγάλος αριθμός μονομερών και πολυμερών δομών που εξυπηρετούν διάφορες λειτουργίες των φυτών. Παρ' όλο που η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών συμμετέχει στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, τα φυτά παράγουν και μια μεγάλη ποικιλία μη δομικών ουσιών με καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την επιβίωσή τους [65]. Οι φυτοφαινόλες συμβάλλουν σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες για την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και την άμυνα έναντι παθογόνων, παρασίτων, θηρευτών, καθώς και UV ακτινοβολίας. Ακόμα, συνεισφέρουν στο χρώμα των φυτών και προσδίδουν γεύση [61, 62].

Λόγω της παρουσίας τους σε όλα τα φυτικά όργανα, είναι αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου και μάλιστα έχουν πολλά ωφέλη για την υγεία. Ως συστατικό πολλών φυτικών τροφίμων (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά κ.α.) και ροφημάτων (τσάι, καφές, κρασί κ.α.), ευθύνονται ως ένα βαθμό για τα συνολικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Οι φυτοφαινόλες κέντρισαν το ερευνητικό ενδιαφέρον χάρη στην αντιοξειδωτική τους δράση και την ικανότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες, συμβάλλοντας στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, μέσω της προστασίας των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Κατά το οξειδωτικό στρες, αυξημένες ποσότητες δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και/ή αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) υπερβαίνουν την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου, οδηγώντας σε οξείδωση ποικίλων βιομακρομορίων (ένζυμα, πρωτεΐνες, DNA, λιπίδια) και συμβάλλοντας στην ανάπτυξη εκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [61, 62, 66].

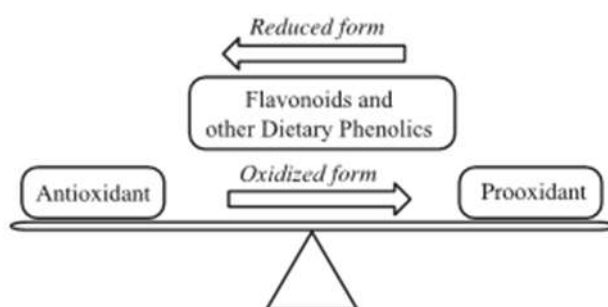
Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που καθυστερούν, αναστέλλουν ή παρεμποδίζουν την οξείδωση υλικών δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας το

οξειδωτικό στρες. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν ιδανική χημική δομή για τη δέσμευση ελεύθερων ριζών, καθώς διαθέτουν:

1. Ομάδες υδροξυλίων που λειτουργούν ως δότες κατιόντων υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες, σύμφωνα με την αντίδραση: $R\cdot + POH \rightarrow RH + PO\cdot$
2. Αρωματικό σύστημα που παρουσιάζει εκτεταμένα συζυγιακά φαινόμενα για να απεντοπίσει μη συζευγμένα ηλεκτρόνια: $PO\cdot + R\cdot \rightarrow POR$ [62].

Εκφράζοντας τόσο αντιοξειδωτικές όσο και προ-οξειδωτικές ιδιότητες ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (συγκέντρωση, θερμοκρασία, pH, παρουσία ιόντων κ.α.), οι πολυφαινόλες του τσαγιού επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση των κυττάρων. Επειδή σχετίζονται με βιολογικούς μηχανισμούς και σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων, ενισχύουν το ρόλο τους στην πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών [67].

Ειδικά όσον αφορά τον καρκίνο, οι συγκεκριμένες ενώσεις μπορούν να επηρεάσουν σημαντικούς κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την καρκινογένεση, όπως η παρεμπόδιση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. MAPKs, PKs), του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και της αγγειογένεσης και η τροποποίηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, που έχει αντίκτυπο στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την ανοσολογική απόκριση και το μεταβολισμό των κυττάρων [66]. Πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν προ-αποπτωτικές ιδιότητες ενάντια σε κακοήθη ή προ-κακοήθη κύτταρα, καθώς και επιλεκτική κυτταροτοξικότητα ως προς τα καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η τοξικότητα αυτή αποδίδεται κυρίως στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων, που επιταχύνει την οξειδωτική βλάβη είτε στο DNA ή σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, καθώς και στις προ-οξειδωτικές τους ιδιότητες. Έχει βρεθεί ότι διάφορα φαινολικά αντιοξειδωτικά συμπεριφέρονται ως προ-οξειδωτικά κάτω από συνθήκες που ευνοούν την αυτοοξειδωσή τους (π.χ. σε υψηλές τιμές pH, με υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων στοιχείων μετάπτωσης, παρουσία μορίων οξυγόνου). Προ-οξειδωτική δράση εμφανίζουν κυρίως μικρές φαινολικές ενώσεις, που εύκολα οξειδώνονται. Αντιθέτως, φαινόλες με μεγάλο μοριακό βάρος δεν εμφανίζουν καθόλου ή εμφανίζουν μειωμένη προ-οξειδωτική δράση, η οποία εξαρτάται άμεσα και από τα δομικά χαρακτηριστικά τους [62, 66, 68].



Εικόνα 7. Η ανηγμένη μορφή των φυτοφαινολών δρα ως αντιοξειδωτικό, ενώ η οξειδωμένη έχει προ-οξειδωτική δράση [69]

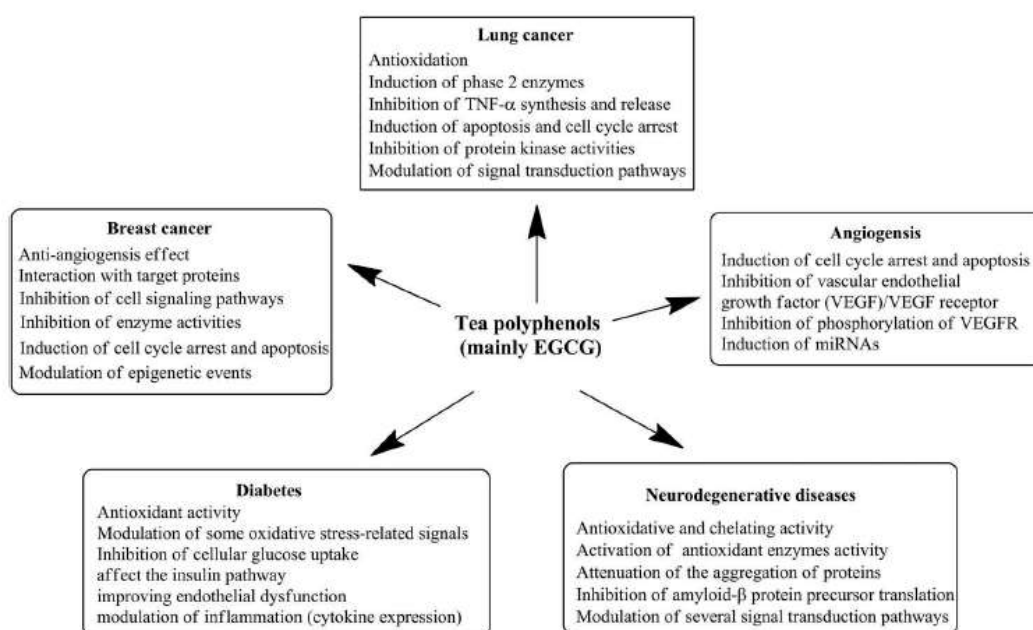
Γαλλικός επιγαλλοκατεχολεστέρης (*Epigallocatechin Gallate, EGCG*)

Ένα από τα πλέον διαδεδομένα ροφήματα παγκοσμίως είναι το πράσινο τσάι, που παράγεται από τα φύλλα του φυτού *Camellia senensis*. Αφεψήματα και εκχυλίσματα του πράσινου τσαγιού καταναλώνονται τόσο ως απλά ροφήματα, όσο και ως φαρμακοτρόφιμα, καθώς εμφανίζουν ποικίλα ωφέλη για την ανθρώπινη υγεία [70]. Η αρχή της κατανάλωσης

τσαγιού τοποθετείται χρονικά στην αρχαία Κίνα και την Ινδία, όπου η χρήση του ως φαρμακευτικό φυτό αποσκοπούσε στην ενίσχυση της καρδιακής υγείας, στον έλεγχο της αιμορραγίας και στην επούλωση τραυμάτων. Τις τελευταίες δεκαετίες, το ενδιαφέρον της χρήσης του πράσινου τσαγιού ως φαρμακοτρόφιμο διαρκώς αυξάνεται, καθώς συσσωρεύονται όλο και περισσότερα στοιχεία από κυτταρικές, επιδημιολογικές μελέτες, καθώς και από μελέτες σε ζώα που συνδέουν την κατανάλωση πράσινου τσαγιού με την πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου, χρόνιας φλεγμονής, καρδιοπάθειας και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων [67].

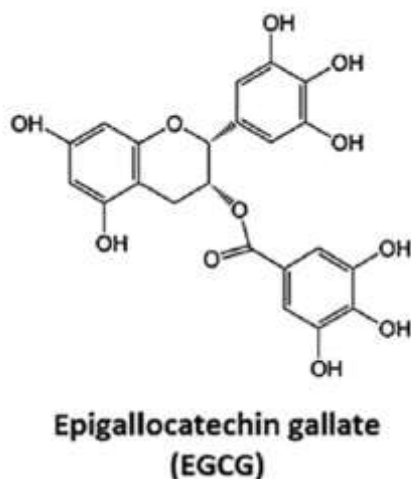
Οι πολυφαινόλικες ενώσεις είναι το κύριο συστατικό του τσαγιού, καλύπτοντας ως και το 30% της ξηρής μάζας των φύλλων του. Οι πολυφαινόλες αυτές αποτελούνται από φλαβονόλες (ή κατεχίνες), φλαβανδιόλες και φαινολικά οξέα, με τις κατεχίνες να απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό [67, 71]. Από αυτές, ο γαλλικός επιγαλλοκατεχυλεστέρας (EGCG) είναι η σημαντικότερη κατεχίνη, που αντιστοιχεί στο 60% των συνολικών κατεχινών του τσαγιού και στην οποία αποδίδεται κυρίως η αντικαρκινική, προστατευτική δράση του [71, 72].

Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τη βιολογική δράση του EGCG. Μερικοί εξ αυτών αφορούν τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, την παρεμπόδιση της μεθυλίωσης του DNA, την παρεμπόδιση της αγγειογένεσης, την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή απόπτωσης, την επίδραση σε μόρια miRNAs και την τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών. Χάρη στη διαθεσιμότητα πολλών αντιδραστηρίων για την έρευνα της κυτταρικής σηματοδότησης, έχει βρεθεί ότι το EGCG επηρεάζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως η παρεμπόδιση κινασών, η καταστολή της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. AP-1 και NFκB) και η παρακώλυση μονοπατιών που ρυθμίζονται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς συμβαίνουν *in vivo* και σχετίζονται με τις ιδιότητες του τσαγιού [36]. Παρακάτω παρουσιάζεται ενδελεχέστερα η αντικαρκινική δράση της συγκεκριμένης πολυφαινόλης.



Εικόνα 8. Βιολογική δράση και μηχανισμοί των κατεχινών του τσαγιού (κυρίως του EGCG) [67]

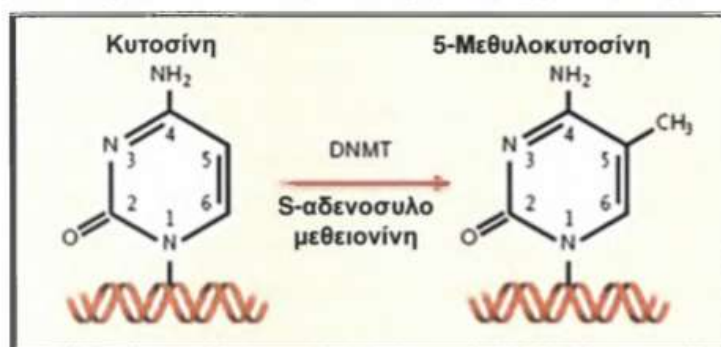
Το EGCG (Εικόνα 9) είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά διατροφικά αντιοξειδωτικά, με ευρέως αναγνωρισμένη προστατευτική δράση έναντι κυτταρικών βλαβών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Για τη δράση του αυτή σημαντική είναι, επίσης, η ικανότητά του να διαπερνά το φράγμα αίματος-εγκεφάλου και να προσεγγίζει τα νευρικά κύτταρα, περιορίζοντας ή αποτρέποντας τις νευρικές απώλειες. Για το λόγο αυτό, το EGCG και άλλα συγγενή του φλαβονοειδή διευρενώνονται και ως θεραπευτικοί παράγοντες για την πρόληψη και την καθυστέρηση της εξέλιξης νευροεκφυλιστικών παθολογιών, όπως η νόσος του Πάρκινσον [73]. Η οξείδωση του EGCG περιλαμβάνει διάφορα μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένης της αυτοοξείδωσης, της οξείδωσης λόγω παρουσίας στοιχείων μετάπτωσης και της ενζυμικά καταλυόμενης οξείδωσης. Η αυτοοξείδωση παρατηρείται σε διάφορους ιστούς, καθώς και στην κυκλοφορία του αίματος, αλλά σε *in vivo* συνθήκες ο βαθμός αυτοοξείδωσης του EGCG είναι χαμηλότερος, λόγω πολυπλοκότερων περιβαλλοντικών συνθηκών απ' ό,τι σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες (χαμηλότερη μερική πίεση οξυγόνου, παρουσία αντιοξειδωτικών ενζύμων) [67].



Εικόνα 9. Χημική δομή EGCG [74]

Έκτός από την ικανότητα του να συλλέγει δραστικές μορφές οξυγόνου, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι το EGCG συμμετέχει και στην παρεμπόδιση της μεθυλίωσης του DNA, λειτουργώντας ως παράγοντας απομεθυλίωσης που αναστέλλει τη δράση ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της μεθυλίωσης [57]. Πιο αναλυτικά, το EGCG δρα ως αναστολέας των τροποποιητικών ενζύμων DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNA Methyltransferases, DNMTs), οι οποίες ευθύνονται για την προσθήκη μεθυλομάδων σε αζωτούχες βάσεις κυτοσίνης (Εικόνα 10), όταν αυτές ακολουθούνται από γουανίνες (CpG δινουκλεοτίδια) [75, 76]. Η συχνότητα εμφάνισης των CpG νουκλεοτιδίων είναι αυξημένη σε περιοχές που ονομάζονται CpG νησίδες (CpG islands), εντοπίζονται στις περιοχές υποκινητών γονιδίων και η κατάσταση μεθυλίωσης τους σχετίζεται με τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου. Όλοι οι τύποι καρκίνου συνδέονται με ανωμαλίες στα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA, με απομεθυλίωση σε περιοχές με ελάχιστα CpG, στις οποίες τα περισσότερα CpG δινουκλεοτίδια θα έπρεπε να είναι μεθυλιωμένα και μεθυλίωση CpG νησίδων σε περιοχές υποκινητών γονιδίων που καθιστούν τα γονίδια μεταγραφικά ανενεργά. Η υπερμεθυλίωση του DNA είναι βασικός επιγενετικός μηχανισμός για τη σίγαση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης, ενώ σημαντική είναι και η υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, που οδηγεί στην απενεργοποίησή

τους. Αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών υποδεικνύουν ότι το EGCG όχι μόνο παρεμποδίζει τη δράση των DNMTs, αλλά προκαλεί, επίσης, απομεθυλίωση και επανενεργοποίηση των μεθυλιωμένων γονιδίων που υπέστησαν σίγαση [75, 77].



Εικόνα 10. Χημική αντίδραση μεθυλίωσης της κυτοσίνης [29]

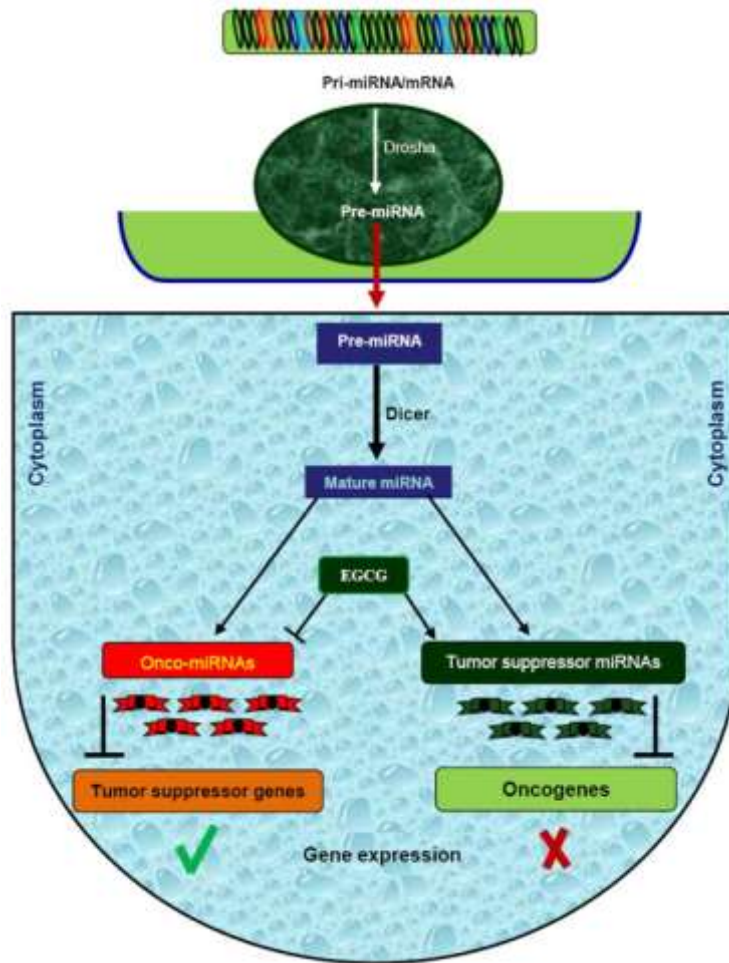
Επιπροσθέτως, το EGCG ανήκει στις φαινολικές ενώσεις με αντι-αγγειογενετική δράση, που είναι σημαντική για την παρεμπόδιση της εξέλιξης του καρκινικού όγκου, της διήθησης και της μετάστασης. Ένας από τους τρόπους αναστολής της αγγειογένεσης μέσω EGCG έγκειται στην αρνητική ρύθμιση διαφόρων αυξητικών παραγόντων (VEGF, PDGF) και υποδοχέων τους (VEGFR-2, PDGFR) με παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης των δεύτερων, καθώς και στην αρνητική ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α) και των MMPs [62]. Επιπλέον, το EGCG παρεμποδίζει την αγγειογένεση και με αναστολή του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή απόπτωσης.

In vitro έρευνες σε κυτταρικές καλλιέργειες έδειξαν ότι το EGCG επάγει την απόπτωση και την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, τροποποιώντας την έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, ενεργοποιώντας κασπάσες τελεστές της απόπτωσης και εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του παράγοντα NFκB. Εκτός από την παρεμπόδιση της πρόσδεσης διαφόρων αυξητικών παραγόντων στους αντίστοιχους υποδοχείς, το EGCG αναστέλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου κατά κύριο λόγο μέσω της άμεσης παρεμπόδισης κινασών CDKs. Ακόμα, πειράματα έκθεσης καρκινικών κυττάρων από ανθρώπινο πάγκρεας σε EGCG έδειξαν αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου μέσω ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1, των κινασών cdk4, cdk6 και των αναστολέων των κινασών p21/WAF1/ CIP1 και p27/KIP1 [46].

Ειδικά όσον αφορά την επαγωγή της απόπτωσης μέσω EGCG, αυτή πραγματοποιείται μέσω απενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Όπως έχει προαναφερθεί, ο NF-κB βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή, συνδεδεμένος στην πρωτεΐνη αναστολέα IκB, αλλά ενεργοποιείται παρουσία ερεθισμάτων και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων [36, 37]. Έρευνες σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων τύπων καρκίνου έδειξαν ότι χρονικά και δοσολογικά εξαρτώμενη έκθεση των κυττάρων σε EGCG αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης IκB και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του NFκB και τη μετακίνησή του στον πυρήνα. Καθώς η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού συστήματος του NFκB ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου, η παρεμπόδιση αποδίδεται στην ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του EGCG και στην ικανότητά του να συλλέγει ελεύθερες ρίζες. Η απενεργοποίηση του NFκB από το EGCG συνεπάγεται άμεση παρεμπόδιση των CDKs, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον NFκB, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην επαγωγή αρνητικών ρυθμιστών διαφόρων γονιδίων. Τέλος η αρνητική ρύθμιση του NFκB

μέσω EGCG έχει βρεθεί ότι συνεπάγεται τη μείωση της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, ενώ αυξάνει τα επίπεδα της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και των κασπασών τελεστών της απόπτωσης -3 και -7 [36, 78].

Άλλη μια πτυχή της αντικαρκινικής δράσης της συγκεκριμένης πολυφαινόλης αφορά την αλληλεπίδραση της με τα microRNAs (miRNAs). Τα miRNAs συνιστούν μια τάξη ενδογενών, μονόκλωνων, μη κωδικοποιητικών, μικρών μορίων RNA (μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων), που συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τα miRNAs συμβάλλουν στη γονιδιακή ρύθμιση, σχηματίζοντας ένα RNA-σύμπλοκο γονιδιακής σίγασης (RNA-induced silencing complex, RISC) που στοχεύει μόρια αγγελιαφόρου RNA (messenger RNA, mRNA). Αρχικά μεταγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου τα πρόδρομα miRNAs (primary miRNAs, pri-miRNAs), τα οποία στη συνέχεια πέπτονται από ένα σύμπλοκο που αποτελείται από την RNάση Drosha και την πρωτεΐνη 8 της κρίσιμης περιοχής του γονιδίου του συνδρόμου DiGeorge (DiGeorge syndrome crucial region of gene 8, DGCR8), σχηματίζοντας τα pre-miRNAs (precursor miRNAs). Αφού ολοκληρωθεί η πέψη, τα pre-miRNAs εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα όπου ολοκληρώνεται η επεξεργασία των μορίων από την RNάση Dicer, ώστε να προκύψουν τα ώριμα miRNAs, τα οποία θα συμμετάσχουν στο σχηματισμό του συμπλόκου RISC. Ο μηχανισμός δράσης τους διαφέρει ανάλογα με το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ miRNA και mRNA-στόχου και μπορεί να προκαλέσει είτε αποικοδόμηση των μεταγράφων ή καταστολή της μετάφρασης. Τα miRNAs μπορεί να έχουν είτε ογκογόνο ρόλο (oncomiRNAs), αν το mRNA-στόχος είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ή ογκοκατασταλτικό ρόλο (tumor-suppressor miRNAs), αν στοχεύουν ογκογόνα γονίδια (Εικόνα 11) [36, 79, 80]. Διαταραχές στα μοτίβα έκφρασης μορίων miRNA συνδέονται με διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος, αφού τα συγκεκριμένα μόρια έχουν καθοριστικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού, στοχεύοντας ποικίλα ογκογόνα ή ογκοκατασταλτικά miRNAs, τροποποιούν τα επίπεδα έκφρασής τους και οδηγούν σε ενεργοποίηση ή παρεμπόδιση ποικίλων κυτταρικών/μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [36, 81]. Μάλιστα, ειδικά όσον αφορά το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα, αποτελέσματα έρευνών έδειξαν ότι η έκθεση κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς HepG2 σε EGCG οδήγησε στην τροποποίηση της έκφρασης 61 miRNAs, προκαλώντας κυτταρική απόπτωση [78].



Εικόνα 11. Επίδραση EGCG στην έκφραση του miRNA [36]

Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου της Δρ. Ελένης Λουτράρη, η οποία κατέδειξε την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης του τρόπου δράσης συγκεκριμένων φαρμακοτροφίμων έναντι HCC κυτταρικών σειρών. Η πρωτεωμική προσέγγιση σε συνδυασμό με την βασισμένη σε υπολογιστική μοντελοποίηση δικτύων ανάλυση δεδομένων που εφαρμόστηκε στην εργασία αυτή αποτέλεσε ένα πρώτο βήμα κατανόησης των μηχανισμών δράσης τέτοιων ουσιών. Από τα αποτελέσματα έγινε κατανοητό πως η πολυφαινόλη EGCG χρήζει ιδιαίτερης μελέτης ως μια από τις ενώσεις που εξετάστηκαν, καθώς εμφανίζει ιδιαίτερη αντιφλεγμονώδη και αντιαγγειογενετική δράση. Η σημαντική επίδρασή της, ιδιαίτερα στα HCC κύτταρα της σειράς Hep3B, στο επίπεδο της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών και της φωσφοπρωτεωμικής απόκρισης, οδηγεί στην ανάγκη μιας πιο διευρυμένης μελέτης του μηχανισμού δράσης της, συμπεριλαμβάνοντας αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης.

Σε επόμενο στάδιο, λοιπόν, η επίδραση της εν λόγω ουσίας διερευνήθηκε σε κυτταροκαλλιέργειες της καρκινικής σειράς Hep3B, τόσο απουσία όσο και παρουσία ενός μείγματος συγκεκριμένων προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (IL-6, IL-1β, TGF-α), γνωστών για το ρόλο τους στην πρόκληση HCC, που στο πειραματικό σύστημα λειτουργούν ως ερεθίσματα (stimuli), ώστε να διεγείρουν σημαντικά σηματοδοτικά δίκτυα. Η επίδραση της στην έκφραση των γονιδίων στηρίχθηκε στην ανίχνευση των επιπέδων των μεταγραφωμάτων (transcripts) στο συνολικό RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα με τη βοήθεια της τεχνολογίας υψηλής απόδοσης αλληλούχισης RNA (RNA-seq). Η διαδικασία αυτή που πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου απέδωσε έναν μεγάλο αριθμό στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων, άμεσα συσχετιζόμενων με ενδιαφέρουσες κυτταρικές λειτουργίες στα πλαίσια μελέτης του ηπατοκαρκινώματος.

Η προκειμένη διπλωματική εργασία εκπονείται ως πειραματική επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων του RNA-seq, εστιάζοντας στη μελέτη της έκφρασης μιας ομάδας στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων (Πίνακας 1), τα οποία έχουν επιλεγεί με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση ως αντιπροσωπευτικά συγκεκριμένων βιολογικών λειτουργιών, όπως η αγγειογένεση, η ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, η αλληλεπίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα και η κυτταρική μετανάστευση. Η πειραματική επαλήθευση των δεδομένων του RNA-seq πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της αντίστροφης μεταγραφής σε συνδυασμό με την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time Reverse Rranscription quantitative Polymerase Chain Reaction) τόσο σε ανεξάρτητο πείραμα, όσο και στο υπάρχον υλικό που χρησιμοποιήθηκε για το RNA-seq.

Πίνακας 1. Εξεταζόμενα γονίδια και βιολογικές λειτουργίες

Gene Symbol	Gene Ontology	Reactome Pathway
ADAMTS9	-	Extracellular matrix organization, degradation of extracellular matrix
CLIC3*	-	-
HSPA2*	-	-
SERPINE1	Extracellular matrix organization, negative regulation of blood coagulation, negative regulation of cell migration, angiogenesis	BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression, extracellular matrix organization, ECM proteoglycans
HSPB1	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	-
PDGFRB	Wound healing, positive regulation of cell migration, positive regulation of smooth muscle cell migration, positive regulation of collagen biosynthetic process	Axon guidance
MMP9	Extracellular matrix organization	Extracellular matrix organization, degradation of extracellular matrix, axon guidance, Collagen formation, EPH-Ephrin signaling, Collagen Degradation, Activation of Matrix Metalloproteinases

*Τα συγκεκριμένα γονίδια αποτελούν βιβλιογραφικές επιλογές

Πειραματικό Μέρος

1. Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την αξιολόγηση της επίδρασης της φυσικής ουσίας EGCG στην έκφραση των προς μελέτη γονιδίων, στα πλαίσια αξιολόγησης σε ανεξάρτητο πείραμα, ξεκινά με καλλιέργεια κυττάρων της επιλεγμένης κυτταρικής σειράς Hep3B και την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς για τη συσχέτιση του αριθμού των κυττάρων με την απορρόφηση στα μήκη κύματος των 595 και 630 nm. Η συσχέτιση πραγματοποιείται με τη μέθοδο του MTT, που στηρίζεται στην αναγωγή από μεταβολικά ενεργά κύτταρα του διαλυτού MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης μπλε/μωβ χρώματος. Ακολουθεί έλεγχος της επίδρασης ενός εύρους συγκεντρώσεων του EGCG στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, με σκοπό να ελεγχθεί ταυτοχρόνως η σχέση συγκέντρωσης-δράσης και να επιλεγεί η κατάλληλη βιολογικά δραστική αλλά μη κυτταροτοξική συγκεντρώση, στην οποία και θα εκτεθούν οι κυτταροκαλλιέργειες σε επόμενο στάδιο. Η επίδραση του EGCG στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προσδιορίζεται, επίσης, με την μέθοδο του MTT. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκ νέου κυτταροκαλλιέργεια με έκθεση στην επιλεγμένη συγκέντρωση πολυφαινόλης και αφού τα δείγματα δοθούν για απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα που έχουν ή δεν έχουν εκτεθεί στην εν λόγω ουσία, ελέγχεται η καθαρότητα αλλά και η συγκέντρωση αυτού και με βάση το υλικό αυτό πραγματοποιείται *in vitro* αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και ανάλυση με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-Time RT-qPCR). Σε τελικό στάδιο, ακολουθεί στατιστική επεξεργασία και σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με τα δεδομένα του RNA-seq. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο και στο υπάρχον υλικό RNA που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση νέας γενιάς.

Στο υποκεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν, καθώς και ο απαιτούμενος εξοπλισμός.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

❖ Εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια

Παρακάτω ακολουθεί καταγραφή του εργαστηριακού εξοπλισμού (συσκευές-όργανα, αναλώσιμα υλικά) και των αντιδραστηρίων που αξιοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση του πειραματικού τμήματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η παρουσίαση γίνεται σε πίνακες (βλ. Πίνακες 2, 3, 4), με παράλληλη παράθεση πληροφοριών των προμηθευτικών εταιρειών.

Πίνακας 2. Επιλεγμένα αντιδραστήρια και εταιρείες παραγωγής τους

Αντιδραστήρια	Εταιρεία παραγωγής
MEM (1X) <i>Minimum Essential Medium</i>	GIBCO
DPBS (1X) <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o CaCl₂, MgCl₂</i>	GIBCO
DPBS (1X) <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with CaCl₂, MgCl₂</i>	GIBCO
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biosera
L-γλουταμίνη	PAN-Biotech
Αντιβιοτικά (Pen/Strep)	PAN-Biotech
NEA – <i>Non essential amino acids</i> (100X)	BIOCHROM
HEPES <i>Buffer Solution (1M)</i>	GIBCO
Trypsin-EDTA 1X in PBS <i>w/o Ca, w/o Mg, w/o Phenol Red, Sterile Filtered</i>	Biosera
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich
MTT (σκόνη)	Sigma-Aldrich
Ισοπροπανόλη	Fisher Scientific
Triton	Fisher Scientific
Διάλυμα HCl 12M	Fisher Scientific
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)	Takara
SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X)	BIOLINE
Gene Specific Primers for Real Time RT-qPCR	Invitrogen Thermo Fisher Scientific

Πίνακας 3. Χρησιμοποιούμενες συσκευές και εταιρείες παραγωγής τους

Συσκευές - Όργανα	Εταιρεία παραγωγής
Θάλαμος νηματικής ροής Safemate 1.2	BIOAIR (Euroclone s.p.a)
Επωαστήρας	Thermo Scientific

FORMA DIRECT HEAT CO₂ incubator	
Φυγόκεντρος SL 16R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Υδατόλουτρο	BACACOS Scientific
Φασματοφωτόμετρο TECAN GENios	TECAN
Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer	Sigma-Aldrich
Μικροσκόπιο Inverted Microscope Axiovert 25	ZEISS
Δοχείο ψύξης κυττάρων υγρού αζώτου CRYOMED	Forma Scientific
Καταψύκτης (-20 °C) LIEBHERR Comfort	LIEBHERR
Καταψύκτης (-80 °C) TSE SERIES	Thermo Scientific
Vortex PRESS-TO-MIX 34524	Snijders
MJ Mini™ Personal Thermal Cycler	BIO-RAD
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	BIO-RAD
NanoDrop NANODROP ONE^C	Thermo Scientific
Φυγόκεντρος EBA 12	Hettick Zentrifugen
Πιπέτες	GILSON
Pipetgun Stripettor Costar	GILSON

Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενα αναλώσιμα και εταιρείες παραγωγής τους

Αναλώσιμα υλικά	Εταιρεία παραγωγής
Αποστειρωμένα σωληνάρια Falcon (15 & 50 mL)	SARSTEDT
Τρυβλία καλλιέργειας θηλαστικών κυττάρων 10cm	Orange Scientific
Τις πιπέτας (10,200,1000 µL)	SARSTEDT
Γυάλινες πιπέτες Pasteur	BRAND
Ορολογικές πιπέτες μιας χρήσης για κυτταροκαλλιέργειες (5 & 10 mL)	Corning Inc.
Σωληνάρια Eppendorf	SARSTEDT
Πλάκες 96 φρεατίων κατάλληλες για κυτταροκαλλιέργειες	Orange Scientific
Ειδικά φιαλίδια για την ψύξη των κυττάρων (cryovials)	Greiner Bio-1
Φίλτρα 0.20µm	MACHEREY-NAGEL
Πλάκες 6 φρεατίων κατάλληλες για κυτταροκαλλιέργειες	Corning Inc.

Κάλυμμα πλάκας (Adhesive Seal Sheets for qPCR)	4titude
Πλάκες 96 φρεατίων για Real Time RT-qPCR	Cell Projects

❖ EGCG

Το EGCG αποτελεί μια πολυφαινόλη που απαντάται στο πράσινο τσάι και της οποίας οι αντικαρκινικές ιδιότητες απασχολούν την παρούσα διπλωματική εργασία. Το EGCG που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία είναι προϊόν της εταιρείας STEMCELL™ TECHNOLOGIES, σε συσκευασία των 50 mg.

❖ Ερεθίσματα (Stimuli)

Για τη δημιουργία ενός προφλεγμονώδους περιβάλλοντος που προσομοιάζει το μικροπεριβάλλον του όγκου, οι κυτταροκαλλιέργειες εκτίθενται σε ένα μίγμα προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε η έκθεση σε TGF- α (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IL-6 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και IL-1b (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Οι ανασυνδυασμένες αυτές ανθρώπινες πρωτεΐνες προμηθεύτηκαν από την εταιρεία PEPROTECH σε λυοφιλοποιημένη μορφή και επαναδιαλύθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις.

❖ Κυτταρικές σειρές

Για τη μελέτη της επίδρασης φυσικών προϊόντων στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα επιλέχθηκε η καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος Hep3B. Η κυτταρική σειρά Hep3B προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα που έχουν ληφθεί από καρκίνωμα του ήπατος οχτάχρονου αγοριού αφροαμερικανικής καταγωγής.

2.2 Μέθοδοι

Παρακάτω αναλύονται όλες οι μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν στο πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Σημειώνεται ότι οι εργασίες που αφορούν την επεξεργασία κυττάρων (παράγραφοι 2.2.1-2.2.9) γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow), εξοπλισμένο με υπεριώδη (UV) λάμπα και φίλτρα αέρος και ότι ο επωαστήρας (incubator) λειτουργεί σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας, στους 37°C, παρουσία 5% CO₂.

2.2.1 Παρασκευή υλικών καλλιέργειας

Κατά την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα υλικά καλλιέργειας, ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε σταδίου σε θρεπτικά υλικά. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μέσα καλλιέργειας:

❖ Πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας κυττάρων (Cell Culture Growth Medium ή Full Medium)

Η σύσταση του συγκεκριμένου μέσου καλλιέργειας αποτελείται από θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), εμπλουτισμένο με 1% Pen/Strep, 1% L-glutamine, 1% NEA και 15mM HEPES (1.5%) και 10% ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS).

- ❖ Πλήρες υλικό καλλιέργειας κυττάρων άνευ ορού (Serum Free Medium)
Η σύστασή του είναι όμοια με του Full Medium, χωρίς την προσθήκη 10% FBS.
- ❖ Υλικό καλλιέργειας κυττάρων με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά (Cell Culture Starvation Medium)
Παρασκευάζεται με προσθήκη 0.25% BSA σε ποσότητα Serum Free Medium.
- ❖ Θρεπτικό υλικό κατάψυξης κυττάρων (Cell Culture Freezing Medium)
Παρασκευάζεται με ανάμιξη ποσότητας Full Medium με 10% DMSO κατάλληλο για κυτταροκαλλιέργειες.

2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium

Μεθοδολογία

Οι κυτταρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων, ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός της καλλιέργειας κυττάρων είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα μακριά από τον οργανισμό από τον οποίο προήλθαν.

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται με εμβολιασμό τρυβλίου που περιέχει ποσότητα θρεπτικού υλικού καλλιέργειας κυττάρων προαναφερόμενης σύστασης (Full Medium) με ¼ της ποσότητας αυτής Full Medium που περιέχει κύτταρα Hep3B. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια διατηρείται σε επωαστήρα.

2.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium
- ❖ Διάλυμα Τρυψίνης-EDTA
- ❖ Διάλυμα PBS (w/o CaCl₂, MgCl₂)

Μεθοδολογία

Κατά την ανάπτυξη τους στο τριβλύο κυτταροκαλλιέργειας, τα επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα μονόστοιβο κυτταρικό στρώμα. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου, κατάσταση κατά την οποία η ανάπτυξή τους δεν επηρεάζεται από την έλλειψη χώρου (σε πολλά είδη κυττάρων η έλλειψη χώρου επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις μεταβολικές διαδικασίες). Η ανακαλλιέργεια γίνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων για την πειραματική διαδικασία, αλλά και η ομαλή ανάπτυξή τους.

Η διαδικασία ξεκινά με παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ώστε να εξακριβωθεί ο βαθμός επικάλυψης του τρυβλίου. Κατά την παρατήρηση αυτή, όσα κύτταρα είναι προσκολλημένα στο τρυβλίο θεωρούνται ζωντανά και υγιή, ενώ όσα επιπλέον είναι νεκρά. Όταν η επικάλυψη φτάσει τα επιθυμητά όρια, το τρυβλίο μεταφέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής για να αρχίσει η ανακαλλιέργεια. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων αρχικά παρασκευάζεται 1:3 διάλυμα τρυψίνης-EDTA (1mL τρυψίνης-EDTA και 2mL PBS),

το οποίο χρησιμοποιείται για την ενζυμική αποκόλληση των κυττάρων. Η πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

Γίνεται υπό κενό αναρρόφηση με πιπέτα Pasteur του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας και ξέπλυμα των κυττάρων δύο φορές με PBS, για την απομάκρυνση τυχόν κυτταρικών υπολειμμάτων και ιχνών ορού. Στη συνέχεια, στο τρυβλίο προστίθενται 2mL διαλύματος τρυψίνης και τοποθετείται για επώαση στους 37°C για το απαραίτητο σύντομο χρονικό διάστημα, με στόχο τη διάσπαση των συνδέσεων των κυττάρων και την αποκόλλησή τους από το τρυβλίο. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, γίνεται παρατήρηση της αποκόλλησης στο μικροσκόπιο (τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί έχουν σφαιρική μορφή και αιωρούνται στο υγρό). Σε περίπτωση που κριθεί απαραίτητο, η αποκόλληση υποβοηθάται με μηχανικό τρόπο. Ακολουθεί αναστολή της δράσης της τρυψίνης με προσθήκη ποσότητας Full Medium και συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 15mL για φυγοκέντρηση σε 1200rpm για 5 min. Έπειτα, γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με Full Medium. Ποσότητα από το τελευταίο εναιώρημα προστίθεται σε τρυβλίο καλλιέργειας, όπου αραιώνεται σε πενταπλάσιο τελικό όγκο Full Medium.

2.2.4 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium
- ❖ Cell Culture Freezing Medium

Μεθοδολογία

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα πραγματοποιείται σε δοχεία υγρού αζώτου, σε θερμοκρασίες -135°C ως -175°C, βαθμιαία μέχρι ένα κρίσιμο σημείο (-20°C) και παρουσία DMSO, για την αποφυγή σχηματισμού πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων και την διάσπαση των μεμβρανών. Βασική προϋπόθεση είναι η καλή μεταβολική κατάσταση των κυττάρων πριν την ψύξη, για αυτό η διαδικασία γίνεται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου. Η πορεία που ακολουθείται για την κατάψυξη περιλαμβάνει τα ίδια βήματα με τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας κυττάρων (βλ. 1.2.2.3) μέχρι το σημείο της επαναιώρησης των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση, μόνο που σε αυτή την περίπτωση η επαναιώρηση πραγματοποιείται με Freezing Medium (βλ. 1.2.2.1). Από την ποσότητα αυτή, το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται σε cryo-vials (ποσότητα 1mL/vial, μέχρι δύο vials ανά 4mL αιωρήματος), πάνω στα οποία αναγράφονται οι απαραίτητες πληροφορίες (κυτταρικός τύπος, ημερομηνία ψύξης κλπ). Τα cryo-vials τοποθετούνται αρχικά για ψύξη στους -80°C και την επόμενη μέρα μεταφέρονται στο δοχείο υγρού αζώτου.

Η απόψυξη κυττάρων αποσκοπεί στην επανακαλλιέργεια κυττάρων που έχουν παραμείνει παγωμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αρχικά γίνεται εντοπισμός του φιαλιδίου των κατεψυγμένων κυττάρων στο δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονται αποθηκευμένα και έπειτα το φιαλίδιο τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να ξεπαγώσουν οι κρύσταλλοι. Τονίζεται ότι η παραμονή του φιαλιδίου στο υδατόλουτρο πρέπει να είναι σύντομη, διότι η έκθεση των κυττάρων στο ξεπαγωμένο DMSO είναι τοξική. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του φιαλιδίου μεταφέρεται με τη βοήθεια μικρής ποσότητας Full Medium σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 15mL, το οποίο περιέχει ήδη 5mL Full Medium. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 min σε 1200rpm και ύστερα το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται, διατηρώντας ανέπαφο το pellet κυττάρων που

έχει σχηματιστεί στον πάτο. Ακολουθεί επαναίωση των κυττάρων με Full Medium, προσθήκη αυτών σε τρυβλίο που περιέχει 5mL Full Medium και διατήρηση στον επωαστήρα.

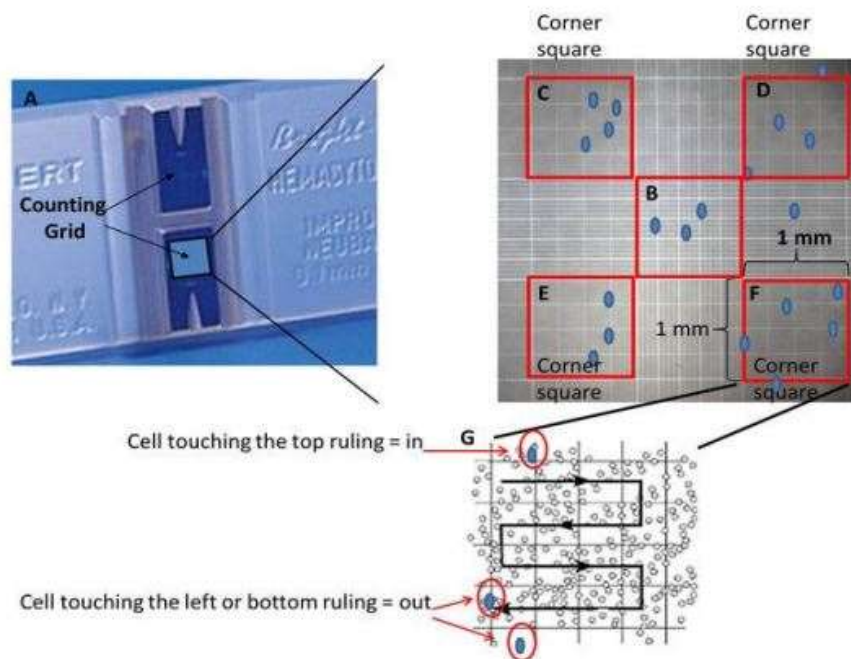
2.2.5 Μέτρηση κυττάρων και στρώσιμο σε πλάκες 96 φρεατίων

Η μέτρηση κυττάρων πραγματοποιείται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 12). Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, καθώς είναι απλή, άμεση και οικονομική. Αποτελείται από μια αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου, κατασκευασμένη από θερμοάντοχο γυαλί, η οποία έχει μια ορθογώνια οδόντωση που δημιουργεί ένα θάλαμο με δύο λείες επιφάνειες μέτρησης ή διαμερίσματα (plateaus) και ειδική καλυπτρίδα. Στο εξωτερικό άκρο κάθε διαμερίσματος υπάρχει ένα αυλάκι σχήματος «V» που επιτρέπει την εισροή του δείγματος, μειώνοντας την πιθανότητα υπερχειλίσσης στα διαμερίσματα. Τα τριχοειδή φαινόμενα που αναπτύσσονται ανάμεσα στην επιφάνεια του θαλάμου και στο προστατευτικό γυαλί της καλυπτρίδας εξασφαλίζουν την ομαλή εισροή του υγρού και την εξάπλωση των κυττάρων στα διαμερίσματα.



Εικόνα 12. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Σε καθένα από τα δύο διαμερίσματα περιέχεται ένα τετράγωνο πλέγμα που φέρει χαραγμένα εννιά τετράγωνα πλευράς 1mm και απόστασης 0.1mm από τις ακμές που στηρίζουν την καλυπτρίδα, έτσι ώστε να περιορίζεται ο όγκος του εξεταζόμενου υγρού σε 0.1mm^3 (ή $1 \times 10^{-4}\text{mL}$) ανά mm^2 . Καθένα από τα εννιά κύρια τετράγωνα φέρει επιπλέον διαβαθμίσεις με τετράγωνα για περαιτέρω διευκόλυνση της μέτρησης των κυττάρων. Στις περισσότερες εφαρμογές, όπως και στη συγκεκριμένη, για τη μέτρηση κυττάρων χρησιμοποιούνται μόνο τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα στις γωνίες κάθε διαμερίσματος (εδώ στα τέσσερα κύρια τετράγωνα C, D, E, F της Εικόνας 13).



Εικόνα 13. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer [82]

Μεθοδολογία

Το πρώτο βήμα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι ο καθαρισμός του αιμοκυτταρομέτρου με νερό και κατόπιν με αιθανόλη και η τοποθέτηση της καλυπτρίδας πάνω στις δύο ράχες. Στη συνέχεια γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων του προς μέτρηση δείγματος που βρίσκεται εντός αποστειρωμένου σωλήνα (falcon) με πιπέτα και λήψη 10μL για εισροή σε κάθε διαμέρισμα του αιμοκυτταρομέτρου. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο σε καθένα από τα τέσσερα εξωτερικά τετράγωνα και ξεκινάει από το πρώτο αριστερό μικρό τετράγωνο της πρώτης σειράς της διαβάθμισης και ακολουθεί πορεία «ζιγκ ζαγκ». Στην καταμέτρηση συμπεριλαμβάνονται όσα κύτταρα βρίσκονται πάνω στις εξωτερικές πλευρές των κύριων τετραγώνων, ενώ εξαιρούνται όσα ακουμπούν στις εσωτερικές πλευρές που αγγίζουν το σταυρό. Ο αριθμός των συνολικών κυττάρων/mL προκύπτει από το μέσο όρο των μετρούμενων κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα $\times 10^4$, αφού κάθε τετράγωνο δέχεται 10^{-4} mL υγρού. Για συνολικό αριθμό κυττάρων (Σ) που μετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο στα τέσσερα τετράγωνα, η πράξη αυτή γίνεται ως εξής:

$$\frac{\Sigma \cdot 10^4}{4} = \Sigma \cdot 2500 \left(\frac{\text{κύτταρα}}{\text{mL}} \right)$$

Με βάση αυτή τη μέτρηση και ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων σε κάθε φρεάτιο της πλάκας των 96 φρεατίων (σε επιλεγμένο τελικό όγκο 100μL), υπολογίζεται ο όγκος των κυττάρων που πρέπει να παραληφθεί από το αρχικό εναιώρημα μετά τη φυγοκέντρωση για τη συνέχιση της καλλιέργειας.

Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Πρώτο

διαμέρισμα:

$C_1 =$

$D_1 =$

$E_1 =$

$F_1 =$

$$\Sigma_1 = C_1 + D_1 + E_1 + F_1 \text{ και}$$

$$M_1 = \Sigma_1 \times 2500 = \dots\dots\dots \text{ cells/mL}$$

Δεύτερο

διαμέρισμα:

$C_2 =$

$D_2 =$

$E_2 =$

$F_2 =$

$$\Sigma_2 = C_2 + D_2 + E_2 + F_2 \text{ και}$$

$$M_2 = \Sigma_2 \times 2500 = \dots\dots\dots \text{ cells/mL}$$

$$X = (M_1 + M_2) / 2 = \text{Αριθμός Κυττάρων} / \text{mL}$$

$$X(\text{cells/mL}) \times V_1(\text{mL}) = Z(\text{cells/mL}) \times V_2(\text{mL})$$

Συνεπώς:

$$V_1(\text{mL}) = (Z \times V_2) / X = \dots\dots\dots \text{ mL}$$

Όπου:

- ❖ V_1 ο όγκος που λαμβάνεται από το διάλυμα με τα κύτταρα,
- ❖ Z η ζητούμενη συγκέντρωση,
- ❖ V_2 ο όγκος που απαιτείται για την πλήρωση της πλάκας 96 φρεατίων και
- ❖ X η συγκέντρωση κυττάρων που υπολογίστηκε πιο πάνω.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται με συμπλήρωση κατάλληλου όγκου από πλήρες θρεπτικό υλικό από V_1 έως V_2 .

2.2.6 Μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) είναι μια μέθοδος υψηλής αποδοτικότητας (highthroughput – 96-wellplate) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων χωρίς πραγματική μέτρηση του αριθμού τους. Η πιο συχνή της εφαρμογή είναι για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας φαρμάκων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι στα ζωντανά κύτταρα η μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι συνεχής και οποιαδήποτε μεταβολή του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σχετίζεται γραμμικά με αυτή. Η οξείδωση του υδατοδιαλυτού άλατος τετραζόλης του MTT, κίτρινου χρώματος, από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων δίνει σκούρους μωβ αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση αυτή πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων [83, 84]. Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των κρυστάλλων φορμαζάνης –άρα και της βιωσιμότητας των κυττάρων- γίνεται με διαλυτοποίησή τους με χρήση ειδικού διαλύματος (stop solution) και μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς τους σε μήκη κύματος 595 και 630 nm.

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium
- ❖ Διάλυμα MTT
- ❖ Stop solution (σύσταση στα 50mL: 45mL ισοπροπανόλη, 5mL Triton, 1 σταγόνα HCl 12M)

Μεθοδολογία

Η προετοιμασία της μεθόδου περιλαμβάνει ζύγιση ποσότητας MTT και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από PBS ή ενέσιμο ύδωρ (water for injection), έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση MTT 5mg/mL. Το διάλυμα ανακινείται στο vortex μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως το MTT και στη συνέχεια φιλτράρεται, μεταφέρεται σε aliquots και αποθηκεύεται στους -20°C, λόγω της θερμοευαισθησίας και φωτοευαισθησίας της ουσίας.

Τα προς μέτρηση κύτταρα ανακαλλιεργούνται σε πλάκα 96 φρεατίων (96-well), στην οποία τοποθετούνται επιθυμητής συγκέντρωσης κύτταρα ανά φρέαρ, σε τελικό όγκο 100μL Full Medium. Έπειτα σε κάθε φρέαρ προστίθενται 10μL από το διάλυμα MTT και η πλάκα αφήνεται για επώαση για τρεις ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών, προστίθενται 100μL stop solution σε κάθε φρέαρ, διαλυτοποιούνται οι σχηματιζόμενοι κρυστάλλοι με τη βοήθεια πολυπιπέτας και η πλάκα φωτομετρείται στα 595 και 630nm.

2.2.7 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium
- ❖ PBS με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+}
- ❖ Cell Culture Starvation Medium
- ❖ Διάλυμα MTT
- ❖ Stop solution (σύσταση στα 50mL: 45mL ισοπροπανόλη-5mL Triton, 1 σταγόνα HCl 12M)

Μεθοδολογία

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας ζεύγη τιμών οπτικής πυκνότητας – αριθμού κυττάρων σε δείγματα γνωστής συγκέντρωσης κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων, μέτρησή τους στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και παρασκευή διαλυμάτων επιθυμητών συγκεντρώσεων με αραιώση του αρχικού διαλύματος, λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο τελικός όγκος κάθε αραιωμένου διαλύματος πρέπει να επαρκεί για προσθήκη από 100μL σε έξι αντίγραφα (technical replicates) ανά στήλη μιας πλάκας 96 φρεατίων. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία στρώθηκαν συγκεντρώσεις 25.000, 16.000, 12.500, 8.000, 6.250, 4000 και 3.125 κυττάρων σε πλάκα 96 φρεατίων, η οποία αφέθηκε σε 24ωρη επώαση. Μετά την επώαση, ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα φρεάτια, ξέπλυμα κάθε φρεατίου με 150μL διαλύματος PBS με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , προσθήκη 100μL Cell Culture Starvation Medium και επώαση για τέσσερις ώρες. Έπειτα εφαρμόζεται η μέθοδος MTT και με τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται η εξίσωση που συνδέει την οπτική πυκνότητα με τον αριθμό των κυττάρων.

2.2.8 Έκθεση κυττάρων σε EGCG

Η έκθεση της κυτταροκαλλιέργειας σε EGCG (treatment) αποσκοπεί στον έλεγχο του εύρους της δραστηριότητας και ενδεχόμενης κυτταροτοξικότητας της συγκεκριμένης ουσίας, έτσι ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη συγκέντρωση στην οποία θα εκτεθούν τα κύτταρα από τα οποία θα απομονωθεί το RNA για τα επόμενα στάδια του πειράματος.

Διαλύματα

- ❖ Cell Culture Growth Medium
- ❖ Διάλυμα PBS (με $CaCl_2$, $MgCl_2$)
- ❖ Cell Culture Starvation Medium
- ❖ Serum Free Medium
- ❖ FBS
- ❖ DMSO
- ❖ EGCG
- ❖ Διάλυμα MTT
- ❖ Stop solution (σύσταση στα 50mL: 45mL ισοπροπανόλη-5mL Triton, 1 σταγόνα HCl 12M)

Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που εφαρμόζεται περιλαμβάνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε πλάκα 96 φρεατίων, όπου τοποθετούνται 4000 κύτταρα ανά φρεάτιο σε 100 μL Full Medium. Κατά το γέμισμα των φρεατίων λαμβάνεται υπόψιν ότι έχουν υπολογιστεί έξι αντίγραφα για κάθε προς εξέταση συγκέντρωση EGCG (1, 5, 10, 15, 20, 25 και 50μM) και δώδεκα αντίγραφα (δύο στήλες) για δείγματα χωρίς την προσθήκη της ουσίας. Η πλάκα τοποθετείται στον επωαστήρα για 16-18 ώρες («overnight»), οπότε και αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας από τα φρεάτια, ξεπλένονται με 150μL PBS με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} και σε καθένα από αυτά προστίθενται 100 μL Cell Culture Starvation Medium, με βάση προηγούμενο εργαστηριακό πρωτόκολλο και στόχο το συγχρονισμό του κυτταρικού κύκλου. Μετά από επώαση τεσσάρων ωρών, το μέσο καλλιέργειας αφαιρείται και σε κάθε φρέαρ προστίθενται 100μL διαλύματος που αποτελείται από Serum Free Medium εμπλουτισμένο με 2.5% FBS, 0.1% DMSO και την επιθυμητή συγκέντρωση EGCG, με εξαίρεση στις δύο στήλες δειγμάτων ελέγχου (control), οι οποίες περιέχουν Serum Free Medium,

εμπλουτισμένο μόνο με 2.5% FBS και 0.1% DMSO. Η έκθεση των κυττάρων στο EGCG είναι 48ωρη και πραγματοποιείται εντός του επωαστήρα. Μετά από δύο μέρες πραγματοποιείται η δοκιμασία MTT (με προσθήκη 9 μ L MTT αντί για 10 μ L, λόγω εξάτμισης του περιεχομένου των φρεατίων, με σκοπό τη διατήρηση της επιθυμητής συγκέντρωσης MTT σε κάθε φρεάτιο) και συλλέγονται τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης.

Σημειώνεται ότι βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, επιλέγη η κατάλληλη συγκέντρωση της πολυφαινόλης και πραγματοποιήθηκε εκ νέου καλλιέργεια κυττάρων σε πλάκα έξι φρεατίων, από την οποία έγινε απομόνωση RNA από τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου της Δρ. Ελένης Λουτράρη και με το RNA αυτό συνεχίστηκε η πειραματική διαδικασία.

2.2.9 Μέτρηση συγκέντρωσης και αξιολόγηση δείγματος RNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου RNA είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό των ποσοτήτων των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στο στάδιο της μεθόδου PCR (βλ. παράγραφο 2.2.10). Εκτός, όμως, από τη συγκέντρωση του δείγματος, απαραίτητη είναι και η εκτίμηση της καθαρότητάς του, αφού το γενετικό υλικό που απομονώνεται βρίσκεται στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων συνδεδεμένο με άλλα μακρομόρια (π.χ. πρωτεΐνες).

Για την αξιολόγηση της καθαρότητας του απομονωμένου RNA χρησιμοποιείται η τιμή απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας του δείγματος στα 260, 230 και 280 nm. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται οι λόγοι απορρόφησης A_{260}/A_{280} και A_{260}/A_{230} . Η μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm αφορά τον προσδιορισμό της ποσότητας των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα. Με τις μετρήσεις στα άλλα δύο μήκη κύματος γίνεται ο εντοπισμός προσμίξεων στο δείγμα RNA, καθώς στα 280 nm παρουσιάζουν έντονη απορρόφηση αρωματικά αμινοξέα, συνεπώς μπορεί να ανιχνευτεί η ύπαρξη πρωτεϊνών, και στα 230 nm υπάρχει απορρόφηση από άλλες ενώσεις. Γενικά, ένα δείγμα θεωρείται «καθαρό» όταν ο δείκτης A_{260}/A_{280} έχει τιμή μεταξύ 1.8-2.2 και ο δευτερογενής δείκτης A_{260}/A_{230} έχει τιμές >1.7 [85].

Διαλύματα

- ❖ RNase free water
- ❖ Δείγματα απομονωμένου RNA

Μεθοδολογία

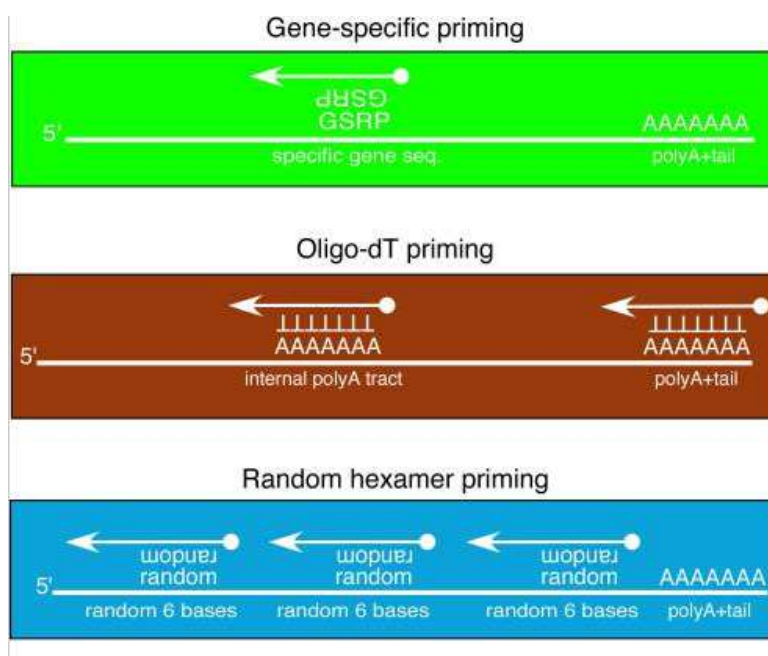
Στην παρούσα διπλωματική εργασία η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου RNA μετρούνται ταυτόχρονα στη συσκευή Nanodrop. Η προετοιμασία των μετρήσεων περιλαμβάνει ξέπλυμα της επιφάνειας μέτρησης και βαθμονόμηση της συσκευής με τυφλό δείγμα (RNase free water). Κατόπιν τοποθετείται με πιπέτα μικρή ποσότητα απομονωμένου RNA (2 μ L) και στο τέλος των μετρήσεων η επιφάνεια ξεπλένεται ξανά με RNase free water.

2.2.10 Μέθοδος Real-time Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (Real-Time RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού (DNA ή RNA) *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται για να

εξυπηρετήσει μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά.

Η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) είναι μια ενζυμική διαδικασία κατά την οποία συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) συντίθεται έχοντας ως αρχικό εκμαγείο μια αλληλουχία RNA με τη δράση RNA-εξαρτώμενων DNA πολυμερασών, όπως π.χ. της αντίστροφης μεταγραφάσης, παρουσία κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών DNA-εκκινητών. Υπάρχουν διάφορα είδη εκκινητών, συμπεριλαμβανομένων εκκινητών ειδικών για το γονίδιο-στόχο (Gene-Specific Reverse Primers, GSRPs), εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης (oligo-deoxythimidine, oligo-dTs) και τυχαίων εξαμερών (p(dn)6). Οι GSRPs είναι ειδικά διαμορφωμένοι ανάλογα με το συντιθέμενο cDNA και συνήθως επιλέγονται για την επιλεκτική μεταγραφή τμήματος RNA. Οι oligo-dTs αποτελούνται από μικρές ακολουθίες θυμινών και στοχεύουν επιλεκτικά τμήματα RNA με πολυA + ουρά, ή οποιοδήποτε τμήμα πολυA αλληλουχιών. Τα τυχαία εξαμερή απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση συνδέουν κατά τυχαίο τρόπο τις συμπληρωματικές RNA αλληλουχίες [86].



Εικόνα 14. Είδη εκκινητών για αντίστροφη μεταγραφή [86]

Η σύνθεση του cDNA μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο, σε ένα αντιδρών μίγμα που περιέχει τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση και πολυμεράσες, με τη χρήση GSRPs. Στην περίπτωση που ως εκκινητές επιλέγονται τυχαία εξαμερή και oligo-dTs, η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται σε δύο στάδια και περιλαμβάνει δυο διακριτές αντιδράσεις (την αντίστροφη μεταγραφή, RT, και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR). Για την ποσοτική RT-PCR (RT-qPCR) επιλέγεται η χρήση τυχαίων εξαμερών, καθώς έτσι επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς και σε όλο το μήκος τους) [86].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται PCR δύο σταδίων, η μεθοδολογία της οποίας παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω.

A. Μέθοδος RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Αντιδραστήρια

- ❖ PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)
- ❖ Απομονωμένο RNA από κύτταρα που υπέστησαν έκθεση σε 25 μM EGCG

Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που ακολουθείται βασίζεται στο πρωτόκολλο του kit για την αντίστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά μετρίεται στη συσκευή Nanodrop η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA του εκάστοτε δείγματος, εάν κριθεί απαραίτητο αυτό αραιώνεται και παρασκευάζεται το αντιδρών μίγμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5. Συστατικά αντιδρώντος μίγματος

Reagent	Amount	Final conc.
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μl	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl	
Oligo dT Primer (50 μM) * 1	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μM) * 1	0.5 μl	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH ₂ O		
Total	10 μl * 2	

*1: Η αποτελεσματική σύνθεση cDNA από συνολικό RNA είναι εφικτή με συνδυαστική χρήση Oligo-dT Primer και Random 6-mers. Για αποκλειστική χρήση ενός εκ των δύο, οι απαιτούμενες ποσότητες εκκινητή διαμορφώνονται ως εξής:

Πίνακας 6. Απαιτούμενες ποσότητες για αποκλειστική χρήση ενός εκκινητή

Primer	Amount	Total Amount (pmol)
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl	25 pmol
Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl	50 pmol
Gene specific primer (2 μM)	0.5 μl	1 pmol

*2: Η κλιμάκωση της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής καθίσταται εφικτή, καθώς μέχρι 500ng συνολικού RNA μπορούν να μετατραπούν σε cDNA με 10 μL του αντιδρώντος μίγματος.

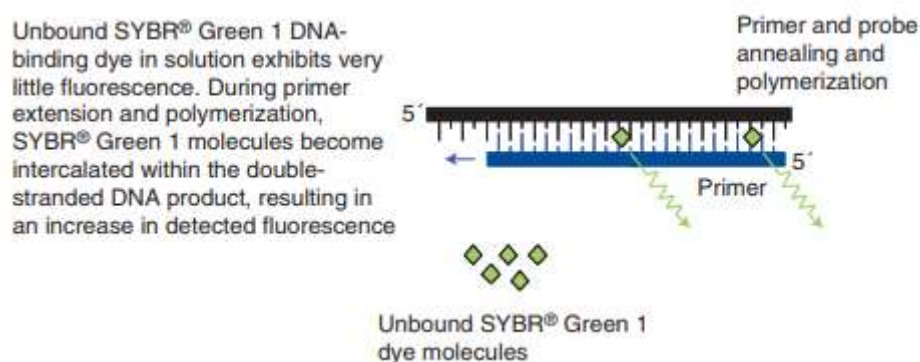
Σημειώνεται ότι στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται κλιμάκωση σε τελικό όγκο αντιδρώντος μίγματος 20 μL , ώστε να χρησιμοποιείται ελάχιστη ποσότητα 1 μL του εκάστοτε δείγματος RNA για την αντίστροφη μεταγραφή και, επομένως, οι ποσότητες των αντιδραστηρίων προσαρμόζονται αναλόγως. Επιπλέον, κατά την παρασκευή πρώτα τοποθετείται σε RNasefree σωληνάριο το νερό και στη συνέχεια τα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Το μίγμα χωρίς την προσθήκη RNA παρασκευάζεται σε ένα σωληνάριο, ως master mix, και ύστερα ισομοιράζεται η απαιτούμενη ποσότητα σε σωληνάρια κατάλληλα για RT-PCR, στα οποία τελικά προστίθεται το RNA. Στη συνέχεια, το τελικό αντιδρών μίγμα επωάζεται στη συσκευή MJ Mini™ Personal Thermal Cycler στις ακόλουθες συνθήκες:

1. Στους 35°C για 15 min (στάδιο αντίστροφης μεταγραφής),
 2. Στους 85°C για 5s (απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφής με θερμική επεξεργασία),
 3. Διατήρηση στους 4 °C.
- Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

B. Μέθοδος Real Time qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)

Η μέθοδος Real Time qPCR αποτελεί μια αξιόπιστη τεχνική ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των προϊόντων ενίσχυσης κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία είναι ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του αρχικού δείγματος. Μια αρκετά διαδεδομένη τεχνική για την ανίχνευση των λαμβανόμενων προϊόντων της PCR (αμπλικονίων, amplicons) είναι η χρήση παρεμβλλόμενων χρωστικών χημικών ουσιών (SYBR Green 1, βρωμιούχο αιθίδιο), καθώς είναι οικονομικότερες και απλούστερες από τη χρήση ιχνηθετών αμπλικονίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με οποιοδήποτε συνδυασμό εκκινητών για οποιοδήποτε γονίδιο-στόχο.

Η ουσία SYBR Green 1 είναι μια βαφή που όταν προσδέεται σε δίκλιωνα μόρια DNA εκπέμπει ισχυρό σήμα φθορισμού. Η αύξηση στην εκπομπή φθορισμού παρατηρείται κατά τον πολυμερισμό του DNA, ενώ η μείωση κατά τη μετουσίωσή του. Μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιούνται στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης σε κάθε κύκλο PCR για να καταγραφεί η αύξηση της ποσότητας του ενισχυμένου DNA. Ωστόσο, μειονέκτημα της συγκεκριμένης ένωσης είναι ότι εκπέμπει φθορισμό παρουσία οποιουδήποτε τμήματος δίκλιωνου DNA, ακόμα κι αν αυτό προέρχεται από την ενίσχυση διμερών που δημιουργούν οι εκκινητές ή άλλων τμημάτων DNA πέραν των γονιδίων-στόχων [87].



Εικόνα 15. Μόρια SYBR Green 1 που συνδέονται σε δίκλιωνα μόρια DNA [87]

Αντιδραστήρια

- ❖ SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X)
- ❖ Gene Specific Primers for Real Time RT-qPCR
- ❖ Δείγματα cDNA
- ❖ H₂O

Μεθοδολογία

Για τη μέθοδο SYBR Green Assay χρησιμοποιείται το SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X) της BIOLINE, σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της BIOLINE και με μικρές τροποποιήσεις, όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο με βάση αποτελέσματα αρχικών δοκιμών. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι το ξεπάγωμα του SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X) και των λοιπών αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντιδραστήρια αναδεύονται, τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για σύντομο χρονικό διάστημα και το περιεχόμενο στον πάτο των σωληναρίων συλλέγεται και διατηρείται σε πάγο, απουσία φωτός. Στη θερμοκρασία δωματίου ή στον πάγο προετοιμάζεται η συνολική ποσότητα

αντιδρώντος μίγματος, αναμιγνύοντας όλα τα αντιδρώντα, εκτός από το δείγμα cDNA, σύμφωνα με τις αναλογίες του Πίνακα 7. Η συνολική ποσότητα του αντιδρώντος μίγματος αναμιγνύεται για να εξασφαλιστεί η ομογενοποίηση του και ύστερα κατανέμεται σε ίσες ποσότητες σε σωληνάρια Ependorf. Σε καθένα από αυτά τα σωληνάρια προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα του δείγματος cDNA (και DNase-free H₂O, εάν χρειάζεται) και στη συνέχεια το περιεχόμενο των σωληναρίων μεταφέρεται στα φρεάτια της πλάκας 96 φρεατίων για Real Time RT-qPCR.

Πίνακας 7. Αναλογίες αντιδραστηρίων

Συστατικό	Όγκος ανά 25μL αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X)	12.5μL	1X
Ευθείς εκκινητές (Forward Primers)	0.5μL	200nM
Αντίστροφοι εκκινητές (Reverse Primers)	0.5 μL	200nM
H₂O	9.5 μL	-
Δείγμα cDNA	2 μL	-
Συνολικός όγκος μίγματος	25 μL	-

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία οι αντιδράσεις έχουν κλιμακωθεί σε τελικό συνολικό όγκο 25μL ανά δείγμα και το δείγμα cDNA που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση πρέπει να είναι λιγότερο από το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης. Επιπλέον, οι FW και RV Primers χρησιμοποιούνται σε αρχική συγκέντρωση 10μM και όγκο 0.5μL ανά 25μL αντίδρασης. Συνεπώς, έχουν τελική συγκέντρωση στο κάθε σωληνάριο στα 200 nM (εντός των ορίων που προτείνεται από το πρωτόκολλο). Από το SensiFAST SYBR Lo-ROX mix (2X) χρησιμοποιούνται με βάση το πρωτόκολλο 12.5μL για κάθε 25μL αντίδρασης. Επίσης, χρησιμοποιούνται 2μL/σωληνάριο από το δείγμα cDNA που έχει προκύψει από την αντίστροφη μεταγραφή που περιγράφεται πιο πάνω, ενώ για τα αρνητικά κοντρόλ (No Template Control, NTC) στη θέση του cDNA προστίθενται 2μL H₂O καθαρού από νουκλεάσες (nuclease free water). Για κάθε 25μL αντίδρασης εκτός από τα προαναφερθέντα, συμπληρώνονται και 9,5μL H₂O καθαρό από νουκλεάσες. Τα αντιδραστήρια προστίθενται με την σειρά που υποδεικνύεται από τον Πίνακα 7.

Μετά τη μεταφορά του αντιδρώντος μίγματος στην πλάκα 96 φρεατίων, αυτή καλύπτεται με ειδικό κάλυμμα (Adhesive Seal Sheets for qPCR) και τοποθετείται στη συσκευή CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System. Τονίζεται ότι σε κάθε κύκλο RT-qPCR εκτός από τα προς εξέταση γονίδια, ελέγχεται και η έκφραση ενός γονιδίου ελέγχου (Housekeeping gene), του GAPDH. Η συνθήκες της RT-qPCR τόσο ως προς τις θερμοκρασίες όσο και ως προς τους χρόνους αλλά και τους απαιτούμενους κύκλους έχουν ρυθμιστεί με βάση τις οδηγίες του πρωτοκόλλου που συνοδεύει το kit της BIOLINE που χρησιμοποιήθηκε:

1. Θέρμανση μίγματος (ενεργοποίηση πολυμεράσης) στους 95°C για 2 min, Και ακολούθως 40 κύκλοι:
2. Μετουσίωση στους 95°C για 5s,
3. Υβριδισμός, επιμήκυνση και ανάγνωση αποτελεσμάτων στους 60°C για 30s. Τέλος, ακολουθεί:

4. Κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting Curve) και ανάγνωση αποτελεσμάτων σε διάστημα 65-95°C με βήμα μετρήσεων 0.5°C για 5s.

Επισημαίνεται ότι όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε δύο τεχνικά αντίγραφα (duplicates), εκτός από αυτές που αφορούν τα αρνητικά δείγματα αναφοράς (No Template Control, NTC) κάθε γονιδίου, που είναι μοναδικές.

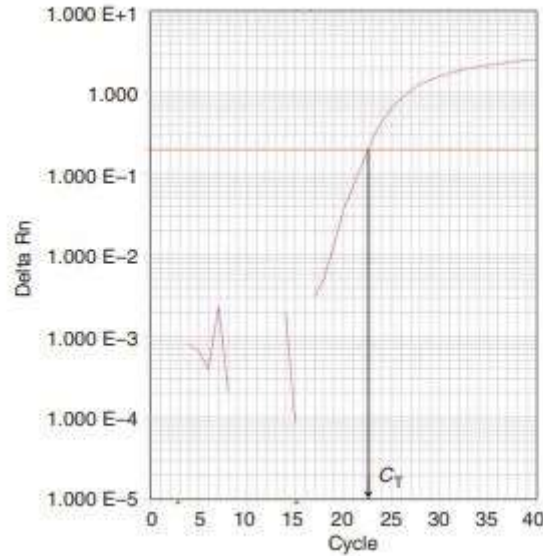
2.2.11 Επεξεργασία και ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία, η ποσοτικοποίηση και η στατιστική ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων πραγματοποιείται με χρήση των λογισμικών GraphPad Prism 6 και Microsoft Excel.

Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων που προκύπτουν από την έκθεση των καρκινικών κυττάρων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων EGCG εστιάζει στην εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών μέσω διεξαγωγής της ανάλυσης διακύμανσης ως προς έναν παράγοντα (One-Way Analysis of Variance ή one-way ANOVA). Λόγω περιορισμένου αριθμού μετρήσεων, δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η κανονικότητα των μετρήσεων σε όλες τις περιπτώσεις, συνεπώς η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με μη παραμετρική προσέγγιση, συγκεκριμένα με Kruskal-Wallis test. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις που απαιτούνται για τον εντοπισμό των σημαντικών διαφορών που σημειώθηκαν στην αρχική ανάλυση ANOVA, χρησιμοποιείται το post-hoc test Dunn's Multiple Comparisons test.

Στο κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας Real Time RT-qPCR, τα αρχικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν τις καμπύλες ενίσχυσης κάθε γονιδίου που προκύπτουν από τη μέτρηση του σήματος φθορισμού σε κάθε κύκλο της PCR (βλ. Εικόνα 16, μπορντώ καμπύλη). Κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων το σήμα φθορισμού είναι χαμηλό και δε διακρίνεται από το μη ειδικό σήμα (background), ενώ όσο προοδεύει η αντίδραση ενίσχυσης αυξάνεται εκθετικά, έως ότου επέλθει η γραμμική φάση. Στο σημείο αυτό η αντίδραση επιβραδύνεται και τελικά η καμπύλη φθορισμού καταλήγει σε ένα σημείο κορεσμού (plateau), λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, μέσω του αριθμού threshold cycle, C_T . Ο αριθμός αυτός αποτελεί ένδειξη του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης στον οποίο εντοπίζεται για πρώτη φορά ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού (threshold) κατά την εκθετική φάση της διαδικασίας Real Time RT-PCR. Πιο αναλυτικά, ο αριθμός C_T αποτελεί το σημείο τομής της καμπύλης ενίσχυσης της αντίδρασης PCR με μια ευθεία (threshold line) που ορίζει το όριο των τιμών φθορισμού που βρίσκονται πάνω από το υπόβαθρο του «θορύβου» (βλ. Εικόνα 16, κόκκινη ευθεία). Προφανώς όσο μικρότερη είναι η τιμή του αριθμού C_T , τόσο υψηλότερη είναι η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου. Σημειώνεται ότι εκτός από την καταγραφή του C_T για καθένα από τα επτά προς εξέταση γονίδια, προσδιορίζεται και το C_T του γονιδίου ελέγχου GAPDH, το οποίο έχει σταθερή έκφραση σε όλες τις προς εξέταση συνθήκες του πειράματος (βλ. Πίνακα 8). Η κανονικοποίηση ως προς το γονίδιο ελέγχου είναι απαραίτητη για τη διόρθωση τυχόν διαφορών στην ποσότητα του βιολογικού υλικού στα δείγματα [88, 89].



Εικόνα 16. Παράδειγμα καμπύλης ενίσχυσης Real-Time PCR. Το όριο ανίχνευσης (threshold line) της έντασης του φθορισμού βρίσκεται πάνω από το υπόβαθρο του «θορύβου». Στον οριζόντιο άξονα σημειώνεται ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την επίτευξη της τιμής threshold, ενώ στον κατακόρυφο φαίνεται η τιμή των επιπέδων φθορισμού [88]

Πίνακας 8. Συνθήκες έκθεσης κυττάρων

Συνθήκη (Condition)	Επεξήγηση
DMSO MEM	Έκθεση κυττάρων σε μέσο καλλιέργειας με ελάχιστα θρεπτικά συστατικά (Minimum Essentials Medium, MEM) και DMSO.
DMSO STIM	Έκθεση κυττάρων σε μέσο καλλιέργειας με ελάχιστα θρεπτικά συστατικά (MEM), DMSO και stimuli.
EGCG MEM	Έκθεση κυττάρων σε μέσο καλλιέργειας με ελάχιστα θρεπτικά (MEM) και EGCG.
EGCG STIM	Έκθεση κυττάρων σε EGCG και stimuli.

Η μέθοδος που επιλέγεται για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι αυτή της σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τις σχέσεις (1) και (2) για να υπολογίσει τη σχετική έκφραση των γονιδίων (Fold Change):

- ❖ $\Delta C_T = C_{T\text{γονιδίου}} - C_{T\text{γονιδίου ελέγχου}}$ (1)
- ❖ $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{δείγματος}} - \Delta C_{T\text{δείγμα control}}$ (2)

Σημειώνεται ότι ως δείγματα control θεωρούνται κάθε φορά οι συνθήκες DMSO με ή χωρίς stimuli [88, 90].

Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης (Fold Change) γίνεται ως εξής:

- ❖ $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, όταν $2^{-\Delta\Delta C_T} > 0$,
- ❖ $Fold\ Change = \frac{1}{2^{-\Delta\Delta C_T}}$, όταν $2^{-\Delta\Delta C_T} < 0$.

Για τη χρήση της παραπάνω μεθόδου γίνεται η παραδοχή ότι η αποδοτικότητα της ενίσχυσης (amplification efficiency) είναι ίση με 2, δηλαδή κάθε διαφορά ενός κύκλου κατά την PCR αντιστοιχεί σε διπλάσια μεταβολή στην αφθονία (abundance) του γονιδίου. Η

παραδοχή αυτή είναι αναγκαία, καθώς δεν πραγματοποιήθηκε κάποιο gradient test για την αξιολόγηση των εκκινήτων.

Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των υπολογισμών της σχετικής έκφρασης τροποποιούνται σε μορφή λογαρίθμου με βάση το 2, για να συγκριθούν με τα αποτελέσματα της RNA-seq ανάλυσης, που δίνονται σε αυτή τη μορφή.

Το τελευταίο κομμάτι της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι ο στατιστικός έλεγχος αυτών. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται με το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test δύο δειγμάτων στην ίδια περίπτωση (ανεξάρτητων δειγμάτων), το οποίο αποτελεί εναλλακτική μορφή του t-test ανεξάρτητων δειγμάτων στην περίπτωση που δεν μπορεί να γίνει παραδοχή κανονικής κατανομής τους. Οι σημαντικές διαφορές που εντοπίζονται, παρουσιάζονται στα αντίστοιχα διαγράμματα που παρουσιάζουν τη μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων σε κάθε συνθήκη. Σημειώνεται ότι κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων το επίπεδο σημαντικότητας των διαφορών απεικονίζεται με τη βοήθεια αστερίσκων, οι οποίοι ερμηνεύονται ως εξής:

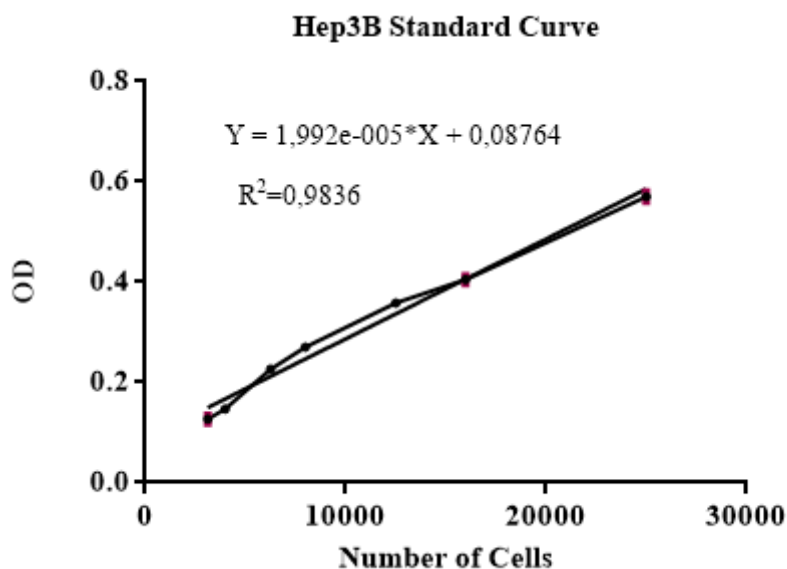
Πίνακας 9. Επεξήγηση συμβόλων επιπέδου σημαντικότητας

Συμβολισμός	Επίπεδο σημαντικότητας
Ns (non significant)	$P > 0.05$
*	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$
****	$P \leq 0.0001$

Αποτελέσματα

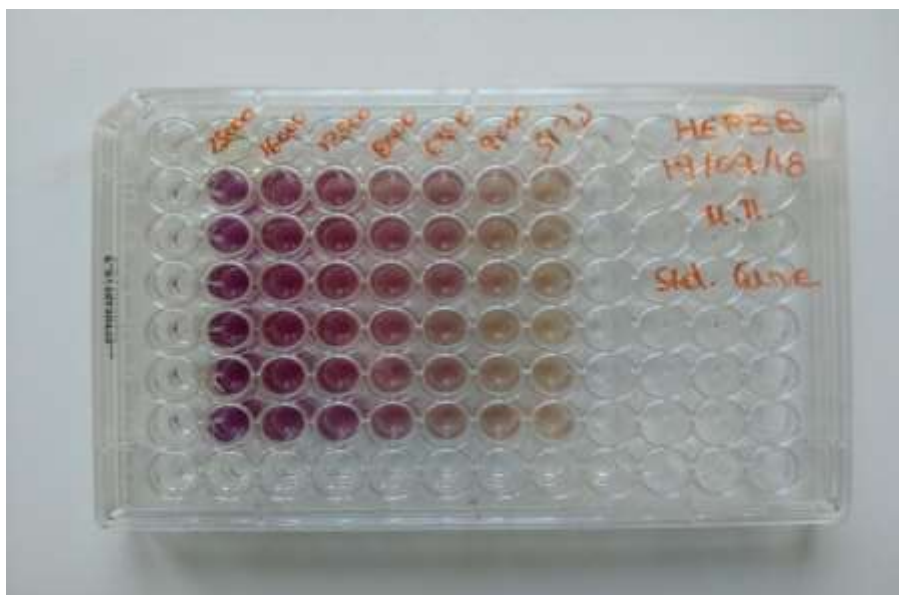
1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Παράτιθεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) - συγκέντρωσης κυττάρων Hep3B, η οποία επιβεβαιώθηκε μέσω τριών βιολογικών πειραμάτων ακολουθώντας τη μέθοδο MTT. Σε κάθε βιολογικό πείραμα, η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 25.000, 16.000, 12.500, 8.000, 6.250, 4000 και 3.125 κυττάρων με έξι αντίγραφα για κάθε συγκέντρωση, σε μήκη κύματος 595 nm και 630 nm και για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκε η τιμή που προέκυψε από τη διαφορά απορρόφησης κάθε κυτταρικής συγκέντρωσης στα δύο μήκη κύματος (595-630 nm). Σημειώνεται ότι στο Διάγραμμα 1 τα σημεία που απεικονίζονται αφορούν τους μέσους όρους των μετρήσεων, παρουσιάζοντας και το τυπικό σφάλμα αυτών (Standard Error of Means, SEM).



Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

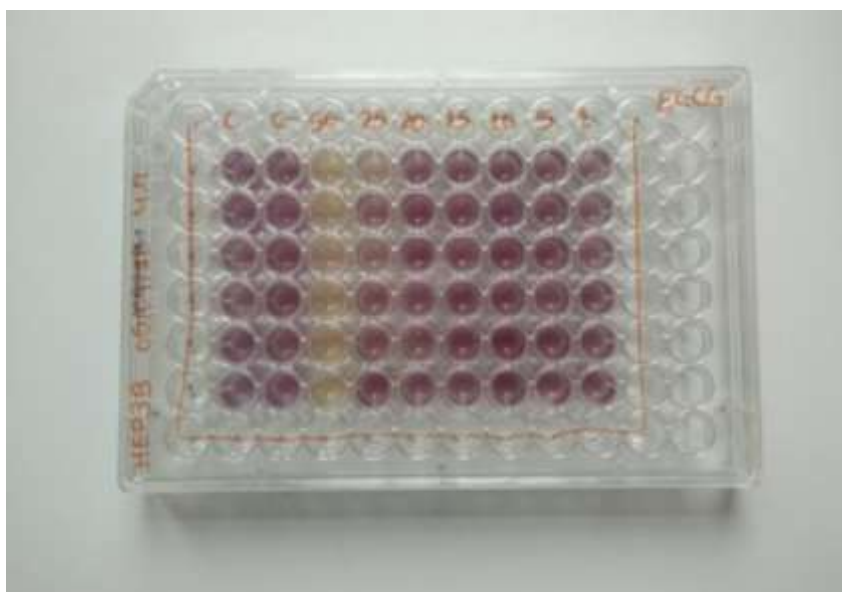
Επιπροσθέτως, ακολουθεί το οπτικό αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στις πλάκες 96 φρεατίων:



Εικόνα 17. Αποτελέσματα μεθόδου MTT για εύρος συγκεντρώσεων κυττάρων από 25000 ως 3125 κύτταρα σε πλάκα 96 φρεατίων

2. Αποτελέσματα έκθεσης των κυττάρων σε EGCG

Για την επιλογή της κατάλληλης, βιοδραστικής αλλά μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης EGCG στην οποία εκτέθηκαν τα κύτταρα, των οποίων το γενετικό υλικό μελετήθηκε σε μετέπειτα πειραματικό στάδιο, υπολογίστηκε κάθε φορά η επί τοις εκατό μεταβολή του αριθμού των κυττάρων κατά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις EGCG σε σχέση με καλλιέργεια ίδιου αριθμού κυττάρων απουσία της πολυφαινόλης (στήλη Control). Με βάση τα πειραματικά δεδομένα, η συγκέντρωση των 50 μM κρίθηκε κυτταροτοξική και απορρίφθηκε, καθώς ο τελικός αριθμός των μετρούμενων κυττάρων βρέθηκε μικρότερος από τη συγκέντρωση των 4000 κυττάρων που στρώθηκε αρχικά, ενώ η συγκέντρωση των 25 μM θεωρήθηκε ως η πιο πολλά υποσχόμενη για τον σκοπό του πειράματος.



Εικόνα 18. Αποτελέσματα MTT μετά τη 48ωρη έκθεση των κυττάρων στις προς εξέταση συγκεντρώσεις

Η διαδικασία επιλογής της επιθυμητής συγκέντρωσης EGCG συνεχίστηκε με τη διεξαγωγή one-way ANOVA μεταξύ των επτά διαφορετικών συγκεντρώσεων και του Control, με δεδομένα δύο βιολογικών πειραμάτων με έξι μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση και δώδεκα μετρήσεις για το Control στο καθένα, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών στον αριθμό των κυττάρων κατά την έκθεση στις επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις του EGCG.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism 6, έχοντας επιλέξει επίπεδο σημαντικότητας $P\text{-value} < 0.05$:

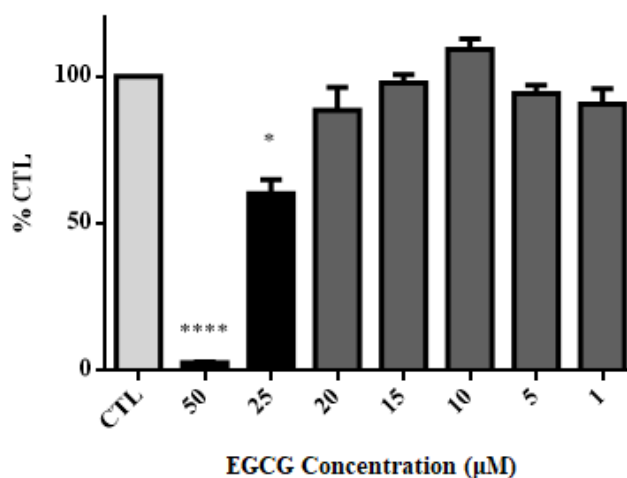
Πίνακας 10. Αποτελέσματα μη παραμετρικής One-Way ANOVA

Kruskal-Wallis test	
P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	57,09

Από τα δεδομένα του Πίνακα 10 απορρέει το συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστική σημαντικότητα σε τουλάχιστον μια στήλη συγκέντρωσης EGCG, αφού προκύπτει $P\text{-value} < 0.0001$. Ωστόσο, η πρωταρχική αυτή ανάλυση δε δίνει στοιχεία για το μεταξύ ποιων συγκεντρώσεων συγκεκριμένα εντοπίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στη συνέχεια, ακολούθησε περαιτέρω διερεύνηση με ανάλυση Dunn's Multiple Comparisons Test για πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των επτά διαφορετικών συγκεντρώσεων με το δείγμα Control, βάσει της οποίας διαμορφώθηκε το Διάγραμμα 2, στο οποίο παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης του EGCG στον αριθμό των κυττάρων, καθώς και η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών με το δείγμα Control, όπου αυτές υπάρχουν. Σημειώνεται ότι οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των δειγμάτων, παρουσιάζοντας και το τυπικό σφάλμα αυτών (SEM).

Από το διάγραμμα αυτό, ως καταλληλότερη επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 25 μM .



Διάγραμμα 2. Επί τοις εκατό μεταβολή της κυτταρικής συγκέντρωσης ως προς το δείγμα Control.

3. Αποτελέσματα Real Time RT-qPCR

Έχοντας επιλέξει τη συγκέντρωση των 25 μM EGCG ως την πλέον κατάλληλη για την έκθεση των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες με τη συνθήκη αυτή, οι οποίες δόθηκαν στην εργαστηριακή ομάδα της Δρ. Ελένης Λουτράρη για να απομονωθεί το RNA των κυττάρων, ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία Real Time RT-qPCR. Σημειώνεται πως όλοι οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία αυτή στηρίχθηκαν στις μετρήσεις συγκέντρωσης και καθαρότητας του απομονωμένου RNA που εμφανίζονται στον Πίνακα 11:

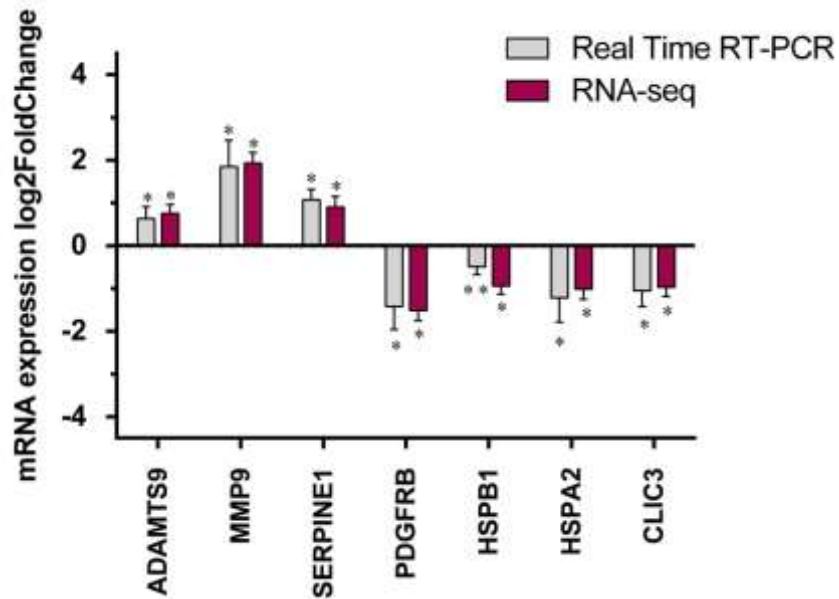
Πίνακας 11. Συγκέντρωση και καθαρότητα απομονωμένου RNA

Συνθήκη	Συγκέντρωση (ng/ μL)	Λόγος απορρόφησης 260/280	Λόγος απορρόφησης 260/230
DMSO	231,9	2,10	1,93
DMSO STIM	312,6	2,10	2,27
EGCG	281,7	2,10	2,19
EGCG STIM	352,3	2,11	2,14

Παρακάτω παρουσιάζονται οι διαφορές στην έκφραση των προς εξέταση γονιδίων κατά την έκθεσή τους σε EGCG συγκριτικά με δείγματα που περιέχουν μόνο DMSO, τόσο παρουσία stimuli (για διαμόρφωση προφλεγμονώδους περιβάλλοντος) όσο και απουσία αυτών με χρήση μέσου καλλιέργειας με ελάχιστα θρεπτικά (MEM). Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από τις μετρήσεις σε δύο ως τρία βιολογικά πειράματα με δύο αντίγραφα για κάθε γονίδιο. Για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δύο διαφορετικών συνθηκών (έκθεση σε DMSO και έκθεση σε EGCG) χρησιμοποιείται το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test δύο δειγμάτων στην ίδια περίπτωση (ανεξάρτητων δειγμάτων).

Σημειώνεται ότι για όλους τους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν έγινε η παραδοχή ότι η αποδοτικότητα των εκκινήτων (efficiency) θεωρήθηκε εξαρχής ίση με 2, δηλαδή κάθε διαφορά ενός κύκλου κατά την PCR αντιστοιχίστηκε σε διπλάσια μεταβολή στην αφθονία (abundance) του γονιδίου. Η παραδοχή αυτή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση της μαθηματικής ανάλυσης των δεδομένων της Real-Time RT-qPCR με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_p}$, η οποία μεταφράζει τις διαφορές στους αριθμούς των κύκλων της PCR σε μεταβολές στην αφθονία των γονιδίων.

Συνεπώς, με βάση τα πειραματικά δεδομένα και την απαραίτητη στατιστική επεξεργασία καταστρώθηκε το Διάγραμμα 3, στο οποίο εστιάζεται και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζονται από κοινού τα αποτελέσματα από την RNA-seq ανάλυση και τα αποτελέσματα που προέκυψαν πειραματικά από τη διαδικασία Real-Time RT-qPCR:



Διάγραμμα 3. Μεταβολή της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων ως προς το control (DMSO) κατά την έκθεση σε EGCG σε συνθήκες STIM, εκφρασμένη σε λογαριθμική (log2) κλίμακα

Το Διάγραμμα 3 αποτελεί την πειραματική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RNA-seq ανάλυσης που έχει προηγηθεί από την εργαστηριακή ομάδα της Δρ. Λουτράρη. Σε όλα τα γονίδια η μεταβολή της έκφρασης κατά την έκθεση σε EGCG σε προφλεγμονώδες περιβάλλον ακολουθεί κοινή τάση τόσο μέσω των αποτελεσμάτων του RNA-seq όσο και μέσω της διαδικασίας Real-Time RT-qPCR. Μάλιστα, οι δύο διαδικασίες συμφωνούν και στην κατεύθυνση και στο μέγεθος της μεταβολής, δίνοντας σημαντικά στατιστικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα control (DMSO-STIM).

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω προκύπτουν αρκετά συμπεράσματα και παρατηρήσεις σχετικά με τα προς μελέτη γονίδια. Καταρχάς, τα αποτελέσματα της Real Time RT-qPCR επαληθεύουν τα αποτελέσματα του RNA-seq της εργαστηριακής ομάδας της Δρ. Ελένης Λουτράρη, καθώς από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο διαδικασιών προκύπτει μια κοινή εικόνα για τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων γονιδίων. Το γεγονός αυτό επισφραγίζει την εγκυρότητα των σημαντικά στατιστικών διαφορών που εντοπίστηκαν στη γονιδιακή έκφραση, καθώς αυτές επιβεβαιώθηκαν τόσο στο υλικό που χρησιμοποιήθηκε για το RNA-seq, όσο και σε ανεξάρτητο πείραμα, και υποδεικνύει την αξιοπιστία και την αξιολόγηση των υπόλοιπων στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων του RNA-seq, που, όμως, ξεπερνά τις βλέψεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Από πλευράς γονιδιακής έκφρασης, τα συμπεράσματα που προκύπτουν για την αντικαρκινική δράση της πολυφαινόλης EGCG παρουσιάζουν αρκετό ενδιαφέρον και για αυτό θα σχολιαστούν εκτενέστερα ανά γονίδιο. Παρακάτω σχολιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για τα επτά εξεταζόμενα γονίδια:

❖ ADAMTS9 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 9)

Το γονίδιο ADAMTS9 κωδικοποιεί την ενδοπεπτιδάση ADAMTS9, της οποίας κύρια λειτουργία είναι η αποδόμηση της πρωτεογλυκάνης, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αποτελεί έναν ενδογενή αναστολέα της αγγειογένεσης τόσο σε φυσιολογικό, όσο και σε παθολογικό υπόβαθρο. Ο τρόπος με τον οποίο αναστέλει το σχηματισμό αγγείων (άρα και την ανάπτυξη του καρκινικού όγκου) είναι η παρεμπόδιση του ογκογενούς μονοπατιού Akt/mTOR/HIF1 και η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως οι MMP9 και VEGF. Από πειραματικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι το γονίδιο αυτό υπο-εκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου (γαστρικός, παχέος εντέρου, παγκρεατικός κ.α.) και ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι η μεθυλίωση των υποκινητών του [91, 92].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατηρείται αποκατάσταση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς η χορήγηση EGCG οδηγεί στην άυξηση της έκφρασής του. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ανασταλτική δράση που εμφανίζει η πολυφαινόλη ως προς τη δράση των DNMTs, εμποδίζοντας τη μεθυλίωση των CpG νησίδων που εμφανίζονται στις περιοχές των υποκινητών του γονιδίου ADAMTS9 [75, 76]. Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, το EGCG προκαλεί και απομεθυλίωση, οπότε είναι πιθανό η αύξηση της έκφρασης που παρατηρείται να οφείλεται σε επανενεργοποίηση του μεθυλωμένου γονιδίου ADAMTS9 [75,77]. Η στατιστικά σημαντική επίδραση του EGCG στην αύξηση της έκφρασης του ADAMTS9 έχει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς γενικά η μεθυλίωση CpG νησίδων σε αντι-ογκογόνους υποκινητές είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται στα πρώτα στάδια εκδήλωσης του ηπατοκαρκινώματος [92].

❖ MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9)

Οι MMPs είναι πρωτεολυτικά ένζυμα, των οποίων ο κύριος μηχανισμός δράσης (η αποδόμηση πρωτεϊνών) ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με τη βιολογία του καρκίνου. Σε ανθρώπινους καρκινικούς όγκους, οι MMPs εκκρίνονται τόσο από τα καρκινικά κύτταρα, όσο και από στρωματικά κύτταρα του όγκου παρακρινικά, μέσω έκκρισης ιντερλευκινών, ιντερφερονών και άλλων αυξητικών παραγόντων από τα καρκινικά

κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα επιστρατεύουν στην κυτταρική τους μεμβράνη MMPs που εκκρίνονται από στρωματικά και φλεγμονώδη κύτταρα για να ενισχύσουν περαιτέρω την εξέλιξη του καρκίνου. Ειδικά η MMP9 είναι μια ενδοπεπτιδάση η οποία εντοπίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον καρκίνο, εκφράζεται κυρίως στα καρκινικά κύτταρα και συνεισφέρει στη διήθηση και τη μετάσταση αυτών [93, 94]. Στο ηπατοκαρκίνωμα, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου MMP9 αποδίδεται στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR, χωρίς, όμως, να έχει αποσαφηνιστεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ενισχύεται η υπερέκφραση αυτή [95].

Παλαιότερα ερευνητικά ευρήματα που αφορούν καρκίνους του στομάχου και του μαστού υποδεικνύουν ότι το EGCG εμφανίζει αντι-διηθητική δράση, ελέγχοντας τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου MMP-9 μέσω καταστολής της ενεργοποίησης των MAPKs και του μεταφραστικού παράγοντα AP-1 και μειώνοντας την ικανότητα πρόσδεσης των παραγόντων NF-κB και AP-1 στον υποκινητή του MMP-9, διακόπτοντας τη μετάφραση του γονιδίου [96, 97]. Επιπλέον, ελπιδοφόρα δεδομένα για την επίδραση του EGCG προκύπτουν και από αποτελέσματα μελετών στο παιδικό σάρκωμα, όπου η χρήση της πολυφαινόλης φάνηκε να μειώνει την έκφραση του MMP-9 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40% [98].

Εφόσον ο μηχανισμός δράσης του EGCG ακολουθεί παρόμοια μοτίβα σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, θα μπορούσε να περιμένει κανείς και στην περίπτωση του ηπατοκαρκινώματος να έχει παρεμφερή αντίκτυπο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω δε συμβαδίζουν με το βιβλιογραφικό υπόβαθρο, καθώς υποδεικνύουν ότι το EGCG αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του MMP-9. Επιπλέον, σε αυτό συμφωνούν και οι δύο μεθοδολογίες (RNA-seq και Real Time RT-PCR), γεγονός που δίνει μεγαλύτερη βαρύτητα στο αποτέλεσμα και ενισχύει τον προβληματισμό. Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης EGCG - MMP-9 και του μηχανισμού μέσω του οποίου το EGCG παρεμβαίνει στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μετάφραση του γονιδίου, εστιασμένη ειδικά στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα, καθώς το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί έναν υποσχόμενο στόχο για αντικαρκινική θεραπεία που δεν επηρεάζει φυσιολογικά κύτταρα, αφού -σε αντίθεση με άλλες MMPs- η υπερέκφρασή του εντοπίζεται κυρίως σε καρκινικά κύτταρα [94].

❖ SERPINE1 (Serpin Family E Member 1)

Το γονίδιο SERPINE1 κωδικοποιεί τον αδρανοποιητή-1 του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1), μιας γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα που ρυθμίζουν την κυκλοφορία του αίματος, συμμετέχοντας στη ρύθμιση του ινωδολυτικού μηχανισμού (δηλαδή του μηχανισμού διάσπασης των θρόμβων του αίματος). Η λειτουργία του έγκειται στη δέσμευση των πρωτεασών-ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ιστικός, t-PA, και τύπου ουροκινάσης, u-PA), οι οποίες το μετατρέπουν σε μια ενεργή μορφή, την πλασμίνη, η οποία καταλύει την αποδόμηση των θρόμβων, αλλά και αρκετών πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας. Εκτός από το ρόλο του στη διάσπαση των θρόμβων του αίματος και στην επιδιόρθωση των ιστών, το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται σε ένα εύρος βιολογικών αντιδράσεων στην εξωκυττάρια μήτρα κυττάρων διαφορετικών τύπων, που σχετίζονται με τη φλεγμονή, τη νεοαγγειογένεση, τη μετανάστευση και τη μετάσταση. Τέλος, ανωμαλίες στην γονιδιακή έκφραση του PAI-1 συνδέονται και με μεταβολικές διαταραχές, όπως ο διαβήτης [99-102].

Σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του PAI-1 [101]. Ο αδρανοποιητής PAI-1 συμμετέχει στην καρκινογένεση επηρεάζοντας την κινητικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων κατά την αγγειογένεση. Η πρόσδεσή του σε ενεργοποιητές του πλασμινογόνου u-PA στην κυτταρική

επιφάνεια προκαλεί απενεργοποίηση των υποδοχέων προσκόλλησης και οδηγεί στην αποκόλληση των κυττάρων από την εξωκυττάρια μήτρα [103].

Δεδομένα από προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο για την έκφραση του SERPINE1 κατέχουν τα επίπεδα μεθυλίωσης στην περιοχή της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση πολλών μεταγραφικών παραγόντων είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη μεθυλίωση συγκεκριμένων CpG νουκλεοτιδίων στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου. Αυτές οι CpG αλληλουχίες μπορεί να είναι είτε CpG νησίδες σε μικρή απόσταση από την περιοχή έναρξης της μεταγραφής ή μικρότερες αλληλουχίες CpG στο 5' άκρο του γονιδίου. Η συχνότητα μεθυλίωσης των αλληλουχιών CpG έχει αντίστροφη συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου [102, 104].

Στα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου SERPINE1. Αυτή η θετική ρύθμιση μπορεί να αποδοθεί στην παρεμποδιστική δράση του EGCG όσον αφορά τη μεθυλίωση γονιδίων [75-77]. Ωστόσο, επειδή το SERPINE1 ήδη υπερεκφράζεται στο ηπατοκαρκίνωμα προάγοντας τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων, η έκθεση σε EGCG φαίνεται να ενισχύει ακόμα περισσότερο την καρκινική δράση του συγκεκριμένου γονιδίου.

❖ PDGFRB (Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta)

Η υπερέκφραση του αυξητικού παράγοντα PDGF και των υποδοχέων του, PDGFR, είναι χαρακτηριστικό ινωδών διαταραχών και κακοηθιών. Στον καρκίνο, οι περισσότερες ογκογενείς ιδιότητες του PDGFRB είναι κατά κύριο λόγο απόρροια της παρακρινούς σηματοδότησης που προκύπτει από την έκκριση PDGF από καρκινικά κύτταρα [105]. Όπως έχει προαναφερθεί και στην εισαγωγή, η μείωση της έκφρασης του PDGFRB είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς της αντι-αγγειογενετικής δράσης του EGCG.

Από τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3 είναι σαφές ότι επιβεβαιώνεται η επίδραση του EGCG στην αρνητική ρύθμιση του υποδοχέα αυξητικών παραγόντων PDGFRB. Βιβλιογραφικά ως τώρα η επίδραση του EGCG ως προς τον PDGFRB αποδίδεται κυρίως στην παρεμπόδιση της τυροσινικής φωσφορυλίωσής του σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Μάλιστα, στο συγκεκριμένο μηχανισμό παρεμπόδισης βασίζονται και άλλα φάρμακα στοχευμένης θεραπείας κατά του καρκίνου (π.χ. Imatinib, Leflunomide) [105, 106]. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά στηρίζονται σε μεμονωμένες δραστηριότητες χημικές ενώσεις και μειονεκτούν έναντι του EGCG, το οποίο χάρη στη φυτική του προέλευση, εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διαδικασιών.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του RNA-seq υποδηλώνουν ότι το EGCG επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της συνολικής ποσότητας του αυξητικού παράγοντα και όχι μόνο της ενεργής (φωσφορυλιωμένης) μορφής του. Το γεγονός αυτό ενισχύει τις σκέψεις για τα οφέλη της αντικατάστασης των συνθετικών φαρμάκων από φυσικά προϊόντα ή της συδυαστικής χρήσης των δύο, καθώς ήδη υπάρχουν ενδείξεις συνεργιστικής δράσης πολλών φαινολικών ενώσεων με χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

❖ HSPB1 (Heat Shock Protein Family B, Small, Member 1)

Η HSPB1 είναι μια μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ (Heat Shock Protein, HSP), η οποία υπερεκφράζεται σε συνθήκες στρες και φλεγμονής στα κύτταρα. Αυξημένα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ανιχνεύονται, επίσης, σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του ήπατος, στους οποίους διαταράσσονται τα μοτίβα φωσφορυλίωσής της. Στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης HSPB1 αποδίδεται η αυξημένη

αντίσταση των κυττάρων σε αρκετούς προ-αποπτωτικούς παράγοντες και κυτταροστατικά αντικαρκινικά φάρμακα [107, 108].

Με βάση την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τόσο η έκφραση όσο και η ενεργοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης εξαρτώνται από τη δράση διάφορων κινασών. Παλαιότερα πειραματικά δεδομένα ερευνών σε οστεοβλάστες συσχετίζουν την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης της κινάσης Akt και του υποστρώματός της, GSK-3β, από το EGCG στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3k/Akt με μείωση της έκφρασης της HSPB1. Παρ' όλο που απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στην αρνητική αυτή ρύθμιση, η παρούσα διπλωματική εργασία ενισχύει τα παραπάνω ευρήματα και η παραπάνω θέση αποτελεί μια πιθανή πρόταση για τον τρόπο δράσης της πολυφαινόλης όσον αφορά το συγκεκριμένο γονίδιο [109].

Εκτός, όμως, από τα επίπεδα έκφρασης είναι γνωστό ότι η δράση της HSPB1 ρυθμίζεται και με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρουσία EGCG ενδεχομένως οφείλεται στην παρεμβολή της πολυφαινόλης στο ενεργοποιημένο στον καρκίνο μονοπάτι MAPK. Σε βιβλιογραφικές πηγές αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει αρκετές περιοχές σερίνης που φωσφορυλιώνονται από κινάσες MAPKs, των οποίων την ενεργοποίηση έχει αποδειχτεί ότι παρεμποδίζει το EGCG σε διάφορους τύπους καρκίνου [97, 108].

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι καθοριστικός παράγοντας για τη δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη φλεγμονή και τον καρκίνο είναι η κατάσταση οξειδωσής της. Για το λόγο αυτό, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση ενώσεων που να διεγείρουν την αντιοξειδωτική συμπεριφορά των HSPs, ώστε να εμποδίσουν την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν την αποτελεσματικότητα αντικαρκινικών θεραπευτικών φαρμάκων, η δράση των οποίων εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση [108]. Στο πλαίσιο αυτό, το EGCG αποτελεί έναν αξιολογούμενο υποψήφιο προς εξέταση, αφού οι φυτοφαινόλες είναι δυνατό να εμφανίζουν τόσο αντιοξειδωτική, όσο και προ-οξειδωτική συμπεριφορά.

❖ HSPA2 (Heat Shock Protein Family A, HSP70, Member 2)

Η HSPA2 είναι ακόμα μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ, μέλος της οικογένειας HSP70, η οποία υπερεκφράζεται στο ηπατοκαρκίνωμα και αρκετές άλλες κακοήθειες, προσφέροντας αντίσταση σε χημειοθεραπείες. Η αύξηση της έκφρασης της HSPA2 προάγει την εξέλιξη του όγκου και συσχετίζεται με το μέγεθος και το στάδιο του. Θεωρείται απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ποικίλων προελεύσεων και, μάλιστα, προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι απομάκρυνση του γονιδίου σε μη καρκινικά αθανατοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα μαστού και προστάτη δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους, γεγονός που υπογραμμίζει την εξειδικευμένη δράση του στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [110-112].

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης είναι επιζήμια και, επομένως, η επίδραση του EGCG που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι επιθυμητή όσον αφορά το ηπατοκαρκίνωμα. Προτάσεις για το μηχανισμό με τον οποίο το EGCG παρεμποδίζει την έκφραση της HSPA2 στον καρκίνο αφορούν την παρεμπόδιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HSF με παρεμπόδιση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και NF-κB [112, 113].

❖ CLIC3 (Chloride Intracellular Channel 3)

Το γονίδιο CLIC3 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως ιοντικός διάυλος χλωρίου. Έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει στην αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας, την αγγειογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση, αλλά όχι τον

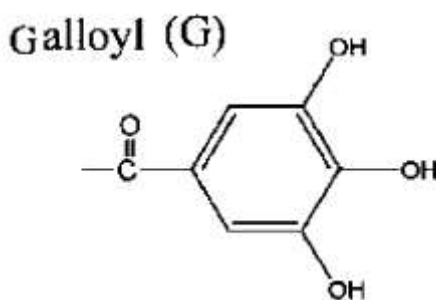
πολλαπλασιασμό, των καρκινικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνου (μαστού, παγκρέατος, ωοθηκών κ.α.), όπου και εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα.[114-116] Στα καρκινικά κύτταρα, η CLIC3 εντοπίζεται σε ενδοσώματα της κυτταρικής μεμβράνης και προάγει τη διήθηση και τη μετάσταση προωθώντας την ανακύκλωση της ιντεγκρίνης $\alpha 5 \beta 1$ και της μεταλλοπρωτεϊνάσης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας MMP-14 και την επιστροφή τους στην πλασματική μεμβράνη. Η ανακύκλωση της ιντεγκρίνης $\alpha 5 \beta 1$ κρίνεται καθοριστική για την επιβίωση της φιβρονεκτίνης, μιας πρωτεΐνης που απαντάται στην εξωκυττάρια ουσία καρκινικών κυττάρων, καθώς αποτελεί την κύρια ιντεγκρίνη-υποδοχέα αυτής [115, 117].

Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι ο κύριος ρόλος της CLIC3 στα κύτταρα είναι να δρα ως οξειδοαναγωγή που εξαρτάται από τη γλουταθειόνη, ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, έχει διαπιστωθεί ότι ως οξειδοαναγωγικό ένζυμο, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ανάγει τις κυστεΐνες της τρανσγλουταμινάσης 2 (Transglutaminase 2, TGM2), ενεργοποιώντας την, και επηρεάζοντας την ικανότητα πρόσδεσής της στους συμπαράγοντές της. Η TGM2 είναι ένα ένζυμο που παράγεται σε αυξημένες ποσότητες στον καρκίνο, σταθεροποιεί την εξωκυττάρια μήτρα των καρκινικών κυττάρων και ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-μήτρας, μέσω της πρόσδεσης σε υποδοχείς της μεμβράνης (όπως π.χ. την ιντεγκρίνη $\beta 1$). Τόσο η ακαμψία της κυτταρικής μεμβράνης που επιφέρει, όσο και η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, προάγουν τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων [116].

Όσα προαναφέρθηκαν ενισχύουν την αντικαρκινική δράση του EGCG που παρατηρείται στην παρούσα διπλωματική εργασία, στην οποία παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου CLIC3 παρουσία EGCG. Παρά την έλλειψη περισσότερων πληροφοριών σχετικά με το μηχανισμό δράσης της πολυφαινόλης ως προς το συγκεκριμένο γονίδιο, εύλογη είναι η υπόθεση ότι η αρνητική ρύθμιση που επιφέρει είναι είτε άμεσο αποτέλεσμα της οξειδωτικής της δράσης, που εξουδετερώνει την αναγωγική δράση της CLIC3, ή έμμεση απόρροια της αλληλεπίδρασης που μπορεί να έχει με τη γλουταθειόνη, η οποία ενώ στα υγιή κύτταρα εντοπίζεται κυρίως στην ανηγμένη της μορφή, σε ανώμαλες καταστάσεις (π.χ. οξειδωτικό στρες) αυξάνει το ποσοστό της οξειδωμένης της μορφής.

Εν κατακλείδι, από τις παραπάνω παρατηρήσεις απορρέει το συμπέρασμα ότι η επίδραση του EGCG στη συγκεκριμένη ομάδα γονιδίων ως επί το πλείστον συνάδει με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Μάλιστα, από το εύρος των λειτουργιών των προς εξέταση γονιδίων υπογραμμίζεται η πολυδιάστατη αντικαρκινική ιδιότητα της πολυφαινόλης, καθώς φαίνεται να εμποδίζει διαφορετικές διαδικασίες του καρκίνου, όπως η αγγειογένεση, η διήθηση και η μετάσταση. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά το EGCG σημαντικό υποψήφιο για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου μέσω θεραπειών πολλαπλών στόχων (multi-target therapies). Αρκετά αισιόδοξο είναι, επίσης, το γεγονός ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν για την επίδραση του EGCG στην παρούσα διπλωματική εργασία και το RNA-seq συνάδουν και με προηγούμενες ερευνητικές μελέτες στον τομέα αυτό (με εξαίρεση το γονίδιο MMP-9), υποστηρίζοντας την αντικαρκινική δράση της πολυφαινόλης. Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι για μια πιο πλήρη εικόνα της συμπεριφοράς των γονιδίων υπό την επίδραση του EGCG πρέπει να πραγματοποιηθούν εκτενέστερα πειράματα που να εξετάζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Αυτό προτείνεται καθώς η γονιδιακή έκφραση είναι και συνάρτηση του χρόνου, και μάλιστα η διαφορετική έκφραση των γονιδίων είναι αυτή που επηρεάζει τις δομικές και λειτουργικές διαφορές των κυττάρων τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές συνθήκες.

Η διερεύνηση της δράσης του EGCG αντικατοπτρίζει μόνο ένα μικρό μέρος του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας για την αξιοποίηση των φυσικών ενώσεων ως φαρμακοτροφίμων. Έχοντας αποδείξει τη δραστηριότητά των πολυφαινολικών ενώσεων, πραγματοποιούνται πλέον εκτενέστερες μελέτες για τον προσδιορισμό της δοσολογίας και της κυτταροτοξικότητάς τους, καθώς και για την εύρεση μεθόδων βελτίωσης της βιοδραστικότητάς τους, με στόχο τελικά την σύνθεση νέων αντικαρκινικών θεραπειών. Την προσοχή κεντρίζουν και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες. Ωστόσο, βασικό εμπόδιο στην κλινική εφαρμογή τους (συμπεριλαμβανομένου και του EGCG) αποτελεί η χαμηλή μεμβρανική διαπερατότητα και η αστάθειά τους [118]. Ειδικά στο πεδίο του καρκίνου, ιδιαίτερη έμφαση προτείνεται να δοθεί στην μελέτη άλλων γαλλικών κατεχυλεστέρων, αφού η έχει αποδειχτεί ότι η εστεροποίηση του γαλλικού οξέος με κατεχίνες αυξάνει σημαντικά την αντικαρκινική τους δράση. Επιπλέον, για τη βελτίωση της φαρμακολογικής δράσης και της σταθερότητας του EGCG πρέπει να εξεταστούν τροποποιημένα δομικά ανάλογά του, που να διατηρούν το τμήμα του 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκού δακτυλίου (Εικόνα 19), στην ύπαρξη του οποίου, αποδίδεται η δραστηριότητά του.



Εικόνα 19. Δραστικό τμήμα EGCG (Galloyl moiety)

Τέλος, όσον αφορά τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, συνετή είναι μετά τη μελέτη της έκφρασης ως ποσότητα mRNA αντιγράφων (μεταγραφικό επίπεδο), η διεξαγωγή μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών (π.χ. ανοσοαποτύπωση). Αυτό προτείνεται γιατί η οδός που συνδέει το DNA (ή RNA) με την τελική πρωτεΐνη περιλαμβάνει και άλλα στάδια μετά τη μεταγραφή. Παρ'όλο που στα περισσότερα γονίδια το σημαντικότερο σημείο είναι ο έλεγχος του τι συμβαίνει κατά τη διαδικασία της μεταγραφής, πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε μέτα-μεταγραφικές ρυθμίσεις για να γίνουν λειτουργικές και ενδεχομένως μεταλλάξεις στους παράγοντες που συντονίζουν αυτές τις ρυθμίσεις να οδηγήσουν σε ανώμαλη ενεργοποίηση-απενεργοποίηση που θα δημιουργήσει παθολογικές καταστάσεις.

Βιβλιογραφία

1. El-Serag H: **Hepatocellular Carcinoma**. *The New England Journal of Medicine* 2011, **365**:1118-1127.
2. Janevska D, Chaloska-Ivanova V, Janevski V: **Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors, Diagnosis and Treatment**. *Open access Macedonian journal of medical sciences* 2015, **3**(4):732-736.
3. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD: **Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis**. *World Journal of Gastroenterology* 2008, **14**(27):4300.
4. Forner A, Llovet JM, Bruix J: **Hepatocellular carcinoma**. *The Lancet* 2012, **379**(9822):1245-1255.
5. McGlynn KA, London WT: **Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma**. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2005, **19**(1):3-23.
6. El-Serag HB, Rudolph KL: **Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis**. *Gastroenterology* 2007, **132**(7):2557-2576.
7. Gerberding JL: **Incidence and Prevalence of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, and Cytomegalovirus among Health Care Personnel at Risk for Blood Exposure: Final Report from a Longitudinal Study**. *Occupational Bloodborne Viruses* 1994, **170**.
8. Xu HZ, Liu YP, Guleng B, Ren JL: **Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: Pathogenic Mechanisms and Novel Therapeutic Interventions**. *Gastrointestinal tumors* 2014, **1**(3):135-145.
9. Di Bisceglie AM: **Hepatitis B and hepatocellular carcinoma**. *Hepatology* 2009, **49**(5 Suppl):S56-60.
10. de Oliveria Andrade LJ, D'Oliveira A, Melo RC, De Souza EC, Costa Silva CA, Parana R: **Association between hepatitis C and hepatocellular carcinoma**. *Journal of global infectious diseases* 2009, **1**(1):33-37.
11. Goossens N, Hoshida Y: **Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma**. *Clinical and molecular hepatology* 2015, **21**(2):105-114.
12. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, Groopman JD: **A Follow-Up Study of Urinary Markers of Aflatoxin Exposure and Liver Cancer Risk in Shanghai, People's Republic of China**. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1994, **3**:3-10.
13. Ozturk M: **p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure**. *The Lancet* 1991, **338**:1356-1359.
14. Baffy G: **Hepatocellular Carcinoma in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention**. *Journal of clinical and translational hepatology* 2013, **1**(2):131-137.
15. Καραμήτσος ΔΘ, Κολιούσκας Δ: **Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος**. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 2008, **21**(2):101-110.
16. Zoller H, Tilg H: **Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma**. *Metabolism* 2016, **65**(8):1151-1160.
17. Chen C, Wang G: **Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy**. *World journal of hepatology* 2015, **7**(15):1964-1970.
18. Thorgeirsson SS, Grisham JW: **Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma**. *Nature Genetics* 2002, **31**.
19. Cha C, Dematteo RP: **Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development**. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2005, **19**(1):25-37.
20. Severi T, van Malenstein H, Verslype C, van Pelt JF: **Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets**. *Acta pharmacologica Sinica* 2010, **31**(11):1409-1420.

21. Aravalli RN, Cressman EN, Steer CJ: **Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update.** *Archives of toxicology* 2013, **87**(2):227-247.
22. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nature medicine* 2004, **10**(8):789-799.
23. Llovet JM, Bruix J: **Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2008, **48**(4):1312-1327.
24. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK: **Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells.** *Cancer research* 2008, **68**(7):2391-2399.
25. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
26. Wong CM, Ng IO: **Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma.** *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2008, **28**(2):160-174.
27. Pang R, Tse E, Poon RT: **Molecular pathways in hepatocellular carcinoma.** *Cancer letters* 2006, **240**(2):157-169.
28. Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, Kuno M, Ito T, Komeda T, Kita R *et al*: **Disruption of the p16/Cyclin D1/Retinoblastoma Protein Pathway in the Majority of Human Hepatocellular Carcinomas.** *Oncology* 2001, **60**:346-354.
29. Johnson DG, Walker CL: **Cyclins And Cell Cycle Checkpoints.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1999, **39**:295-312.
30. Ciemerych MA, Sicinski P: **Cell cycle in mouse development.** *Oncogene* 2005, **24**(17):2877-2898.
31. Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN: **Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2008, **48**(6):2047-2063.
32. Song G, Ouyang G, Bao S: **The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005, **9**(1):59-71.
33. Neubauer K, Saile B, Ramadori G: **Liver fibrosis and altered matrix synthesis.** *Can J Gastroenterol* 2001, **15**(3):187-193.
34. He G, Karin M: **NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer.** *Cell research* 2011, **21**(1):159-168.
35. Νομικού Ε, Ντουράκης ΣΠ: **Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και κίρρωση του ήπατος.** *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2014, **31**(2):137-149.
36. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK: **Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications.** *Biochemical pharmacology* 2011, **82**(12):1807-1821.
37. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H: **Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis.** *Oncogene* 2004, **23**(14):2507-2522.
38. Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Latasa MU, Prieto J, Avila MA: **Inflammation and liver cancer: new molecular links.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, **1155**:206-221.
39. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D: **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(1):41-51.
40. Muto J, Shirabe K, Sugimachi K, Maehara Y: **Review of angiogenesis in hepatocellular carcinoma.** *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2015, **45**(1):1-9.
41. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK: **Extracellular matrix structure.** *Advanced drug delivery reviews* 2016, **97**:4-27.
42. Kouvidi K, Berdiaki A, Nikitovic D, Katonis P, Afratis N, Hascall VC, Karamanos NK, Tzanakakis GN: **Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA)-mediated**

- fibrosarcoma cell adhesion.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(44):38509-38520.
43. Lu P, Weaver VM, Werb Z: **The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression.** *The Journal of cell biology* 2012, **196**(4):395-406.
 44. Arthur MJP: **Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis.** *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000, **279**:245-249.
 45. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK: **Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *The FEBS journal* 2011, **278**(1):16-27.
 46. Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, Srivastava RK: **EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer.** *Frontiers in Bioscience* 2008, **13**:440-452.
 47. Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC: **Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation.** *Biochimie* 2005, **87**(3-4):353-360.
 48. Shen Z: **Genomic instability and cancer: an introduction.** *Journal of molecular cell biology* 2011, **3**(1):1-3.
 49. Sandin S, Rhodes D: **Telomerase structure.** *Current opinion in structural biology* 2014, **25**:104-110.
 50. de Mejia EG, Dia VP: **The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells.** *Cancer metastasis reviews* 2010, **29**(3):511-528.
 51. Santini A, Novellino E: **To Nutraceuticals and Back: Rethinking a Concept.** *Foods* 2017, **6**(9).
 52. Karla EK: **Nutraceutical - Definition and Introduction.** *AAPS PharmSci* 2003, **5**(3).
 53. Ji HF, Li XJ, Zhang HY: **Natural products and drug discovery.** In: *EMBO reports*. vol. 10: European Molecular Biology Organization; 2009: 194-200.
 54. Gordaliza M: **Natural products as leads to anticancer drugs.** *Clinical and Translational Oncology* 2008, **9**(12):767-776.
 55. Carmona F, Soares Pereira AM: **Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013, **23**(2):379-385.
 56. Michailidou M, Melas IN, Messinis DE, Klamt S, Alexopoulos LG, Kolisis FN, Loutrari H: **Network-Based Analysis of Nutraceuticals in Human Hepatocellular Carcinomas Reveals Mechanisms of Chemopreventive Action.** *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 2015, **4**(6):350-361.
 57. Shankar E, Kanwal R, Candamo M, Gupta S: **Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: Promise and challenges.** *Seminars in cancer biology* 2016, **40-41**:82-99.
 58. Dias DA, Urban S, Roessner U: **A historical overview of natural products in drug discovery.** *Metabolites* 2012, **2**(2):303-336.
 59. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG: **Natural Products (Secondary Metabolites).** In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. edn. Edited by Buchanan B, Gruissem W, Jones R: American Society of Plant Physiologists; 2000: 1250-1318.
 60. Yoshimatsu K: **Tissue culture of medicinal plants: Micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolites.** *Studies in Natural Products Chemistry* 2008, **34**:647-752.
 61. Adefegha SA: **Functional Foods and Nutraceuticals as Dietary Intervention in Chronic Diseases; Novel Perspectives for Health Promotion and Disease Prevention.** *Journal of dietary supplements* 2018, **15**(6):977-1009.
 62. Dai J, Mumper RJ: **Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.** *Molecules* 2010, **15**(10):7313-7352.
 63. Gaosheng H, Jingming J: **Production of Useful Secondary Metabolites Through Regulation of Biosynthetic Pathway in Cell and Tissue Suspension Culture of Medicinal Plants.** 2012.

64. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H: **Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants.** *Toxicology* 2002, **177**:67-80.
65. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S: **Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology.** *Plant physiology and biochemistry : PPB* 2013, **72**:1-20.
66. Fresco P, Borges F, Marques MPM, Diniz C: **The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis.** *Current Pharmaceutical Design* 2010, **16**:114-134.
67. Li F, Wang Y, Li D, Chen Y, Qiao X, Fardous R, Lewandowski A, Liu J, Chan TH, Dou QP: **Perspectives on the recent developments with green tea polyphenols in drug discovery.** *Expert opinion on drug discovery* 2018, **13**(7):643-660.
68. Gomes CA, Girao da Cruz T, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MPM: **Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2003, **46**:5395-5401.
69. Galati G, O'Brien PJ: **Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.** *Free radical biology & medicine* 2004, **37**(3):287-303.
70. Coppock RW, Dziwenka M: **Green Tea Extract.** 2016:633-652.
71. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM: **Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2004, **18**(5):555-561.
72. Kumar G, Farooqui M, Rao CV: **Role of Dietary Cancer-Preventive Phytochemicals in Pancreatic Cancer Stem Cells.** *Current Pharmacology Reports* 2018, **4**(4):326-335.
73. Vignes M, Maurice T, Lante F, Nedjar M, Thethi K, Guiramand J, Recasens M: **Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG).** *Brain research* 2006, **1110**(1):102-115.
74. Filippi A, Picot T, Aanei CM, Nagy P, Szollosi J, Campos L, Ganea C, Mocanu MM: **Epigallocatechin-3-O-gallate alleviates the malignant phenotype in A-431 epidermoid and SK-BR-3 breast cancer cell lines.** *International journal of food sciences and nutrition* 2018, **69**(5):584-597.
75. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS: **Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines.** *Cancer research* 2003, **63**:7563-7570.
76. Szyf M: **DNA Methylation and Demethylation as Targets for Anticancer Therapy.** *Biochemistry (Moscow)* 2005, **70**(5):651-669.
77. Herman JG, Baylin SB: **Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation.** *The New England Journal of Medicine* 2003, **349**:2042-2054.
78. Tsang WP, Kwok TT: **Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells.** *The Journal of nutritional biochemistry* 2010, **21**(2):140-146.
79. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY: **MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials.** *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1803**(11):1231-1243.
80. MacFarlane LA, Murphy PR: **MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.** *Current Genomics* 2010, **11**:537-561.
81. Rashidi B, Malekzadeh M, Goodarzi M, Masoudifar A, Mirzaei H: **Green tea and its anti-angiogenesis effects.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2017, **89**:949-956.
82. Μ. Ι: **Βελτιστοποίηση καλλιέργειας ινοβλαστών σε ικρίσματα από κολλαγόνο για πρωτεομικές μελέτες σηματοδότησης.** Αθήνα: Ε. Μ. Π.; 2015.

83. Van Meerloo J KGJL, Cloos J. : **Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay**. In: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology. Volume 731*, edn. Edited by A. CI: Springer Science+Business Media; 2011: 237-245.
84. Mosmann T: **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. *Journal of Immunological Methods* 1983, **65**:55-63.
85. Wieczorek D. DL, Schagat T.: **Methods of RNA Quality Assessment**. In: *Scientific Style and Format: Nov 8 2006*; 2006.
86. Bookout AL, Mangelsdorf DJ: **Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways**. *Nuclear receptor signaling* 2003, **1**:e012.
87. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR: **Basic principles of real-time quantitative PCR**. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2005, **5**(2):209-219.
88. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method**. *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
89. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L *et al*: **The real-time polymerase chain reaction**. *Molecular aspects of medicine* 2006, **27**(2-3):95-125.
90. Schmittgen TD, Livak K. J.: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method**. *NATURE PROTOCOLS* 2008, **3**(6):1101-1108.
91. Kumar S, Rao N, Ge R: **Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer**. *Cancers* 2012, **4**(4):1252-1299.
92. Li S. M. WL, Zhang L., Zhang B., Guo W.: **Promoter hypermethylation mediates the down-regulated expression of ADAMTS9 and is associated with the prognosis in hepatocellular carcinoma**. *Int J Clin Exp Pathol* 2016, **9**(9):9646-9656.
93. Egeblad M, Werb Z: **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression**. *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(3):161-174.
94. Chen R, Cui J, Xu C, Xue T, Guo K, Gao D, Liu Y, Ye S, Ren Z: **The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection**. *Annals of surgical oncology* 2012, **19** Suppl 3:S375-384.
95. Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, Chen LZ, Tan HX, Li W, Bi J *et al*: **Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9**. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2009, **39**(2):177-186.
96. Sen T. DA, Chatterjee A.: **Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFκB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231**. In: *Anti-Cancer Drugs*. vol. 21: Department of Receptor Biology and Tumor Metastasis, Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India; 2010: 632-644.
97. Kim H. S. KMH, Jeong M., Hwang Y. S., Lim S. H., Shin B. A., Ahn B. W., Jung Y. D.: **EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells**. *Anticancer Res* 2004, **24**(2B):747-753.
98. Roomi MW, Kalinovskiy T, Rath M, Niedzwiecki A: **In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in pediatric human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors**. *International journal of oncology* 2014, **44**(1):27-34.
99. J. M: **Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions**. *Rinsho Ketsueki* 1991, **32**(5):487-489.

100. Binder B. R. CG, Gruber F., Grubic N., Hufnagl P., Krebs M., Mihaly J., Prager G. W.: **Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and Pathophysiological Roles.** *News physiol Sci* 2002, **17**:56-61.
101. Gao S, Nielsen BS, Krogdahl A, Sorensen JA, Tagesen J, Dabelsteen S, Dabelsteen E, Andreasen PA: **Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa.** *Genes, chromosomes & cancer* 2010, **49**(6):526-538.
102. Lopez-Legarrea P. MML, Zulet M. A., Martinez J. A.: **SERPINE1, PAI-1 protein coding gene, methylation levels and epigenetic relationships with adiposity changes in obese subjects with metabolic syndrome features under dietary restriction.** *J Clin Biochem Nutr* 2013, **53**(3):139-144.
103. Mazzoccoli G, Paziienza V, Panza A, Valvano MR, Benegiamo G, Vinciguerra M, Andriulli A, Piepoli A: **ARNTL2 and SERPINE1: potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2012, **138**(3):501-511.
104. Andreasen PA, Sørensen JA, Krogdahl A, Skeldal S, Gao S: **CpG methylation of the PAI-1 gene 5'-flanking region is inversely correlated with PAI-1 mRNA levels in human cell lines.** *Thrombosis and Haemostasis* 2017, **94**(09):651-660.
105. Weissmueller S, Manchado E, Saborowski M, Morris JPt, Wagenblast E, Davis CA, Moon SH, Pfister NT, Tschaharganeh DF, Kitzing T *et al*: **Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling.** *Cell* 2014, **157**(2):382-394.
106. Arora A, Scholar EM: **Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005, **315**(3):971-979.
107. Eto D. HT, Horiuchi H., Uchida S., Ishikawa H., Kawashima Y., Kinugasa T., Nakashima O., Yano H., Okuda K., Akagi Y.: **Expression of HSP27 in Hepatocellular Carcinoma.** *Anticancer Res* 2016, **36**:3775-3780.
108. Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P: **Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets.** *FEBS letters* 2007, **581**(19):3665-3674.
109. Kozawa: **(-)-Epigallocatechin gallate attenuates the induction of HSP27 stimulated by sphingosine 1-phosphate via suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in osteoblasts.** *International Journal of Molecular Medicine* 2009, **24**(02).
110. Fu Y, Zhao H, Li XS, Kang HR, Ma JX, Yao FF, Du N: **Expression of HSPA2 in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, **35**(11):11283-11287.
111. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M: **Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms.** *Genes & development* 2005, **19**(5):570-582.
112. Tran PL, Kim SA, Choi HS, Yoon JH, Ahn SG: **Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo.** *BMC cancer* 2010, **10**:276.
113. Tang XY ZY: **Epigallocatechin-3-Gallate Suppressed the Over-Expression of HSP 70 and MDR1 Induced by Heat Shock in SGC 7901.** *Journal of Chemotherapy* 2008, **20**(3):355-360.
114. Wang Z, Ling S, Rettig E, Sobel R, Tan M, Fertig EJ, Considine M, El-Naggar AK, Brait M, Fakhry C *et al*: **Epigenetic screening of salivary gland mucoepidermoid carcinoma identifies hypomethylation of CLIC3 as a common alteration.** *Oral oncology* 2015, **51**(12):1120-1125.
115. Macpherson IR, Rainero E, Mitchell LE, van den Berghe PV, Speirs C, Dozynkiewicz MA, Chaudhary S, Kalna G, Edwards J, Timpson P *et al*: **CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer.** *Journal of cell science* 2014, **127**(Pt 18):3893-3901.

116. Hernandez-Fernaund JR, Ruengeler E, Casazza A, Neilson LJ, Pulleine E, Santi A, Ismail S, Lilla S, Dhayade S, MacPherson IR *et al*: **Secreted CLIC3 drives cancer progression through its glutathione-dependent oxidoreductase activity.** *Nature communications* 2017, **8**:14206.
117. Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, Grindlay J, van den Berghe PV, von Thun A, Morton JP, Gourley C, Timpson P, Nixon C *et al*: **Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression.** *Developmental cell* 2012, **22**(1):131-145.
118. Chen D, Wan SB, Yang H, Yuan J, Chan TH, Dou QP: **EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment.** 2011, **53**:155-177.