



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ HSP70**

**ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ ΠΑΠΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΠΜΣ (ΒΒΕ), ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)**

**ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ HSP70**

**ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ ΠΑΠΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΠΜΣ (ΒΒΕ), ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023**

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

**Όνοματεπώνυμο:** Γαρυφαλλιά Παπά

**Τίτλος Μεταπτυχιακής Διατριβής:** Φλαβονοειδή και HSP70

**Ημερομηνία Παρουσίασης:** ... Ιουλίου 2023

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Αξιολόγησης:**

- 1. Πατρώνα Βεζυράκη (Επιβλέπουσα):** Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- 2. Αγγελίδης Χαράλαμπος:** Ομότιμος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- 3. Περικλής Παππάς:** Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» με κατεύθυνση την «Εφαρμοσμένη Βιοϊατρική». Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα άτομα που συνέβαλαν επιστημονικά και ηθικά στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, και κατ' επέκταση των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Πατρώνα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Διευθύντρια του ΠΜΣ (ΒΒΕ), αφενός για την αμέριστη και πολύτιμη στήριξή της σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, και αφετέρου για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή διατριβή μου υπό την καθοδήγησή της. Η συνεργασία μας αποτελεί μεγάλη τιμή και χαρά για εμένα, καθώς οι γνώσεις που έλαβα στα πλαίσιά της, θα αποτελέσουν πυλώνα για την μετέπειτα επιστημονική και επαγγελματική μου σταδιοδρομία. Έπειτα, θα ήθελα ευχαριστήσω από καρδιάς τα σπουδαία άτομα που γνώρισα και συνεργάστηκα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, όπου ο καθένας με τον τρόπο του συνέβαλε ώστε η παρούσα διπλωματική εργασία να ολοκληρωθεί επιτυχώς.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Ιωάννη Σίμο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος από την πρώτη στιγμή αποτέλεσε πηγή στήριξης και ενθάρρυνσης, καθώς η ανταπόκρισή του ήταν πάντοτε άμεση, και ο ίδιος διαρκώς πρόθυμος και διαθέσιμος για συζήτηση και ανατροφοδότηση σχετικά με τα θέματα που προέκυπταν όλο αυτό το διάστημα. Οφείλω επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Άντρεα Μαρία Αθηνοδώρου, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την άψογη συνεργασία μας, το φιλικό περιβάλλον που εξασφάλισε στον εργαστηριακό χώρο, αλλά και για την πολύτιμη έμπρακτη βοήθειά και συμβολή της, προσφέροντας ανιδιοτελώς τις γνώσεις, την υπομονή, καθώς και το χρόνο της. Το αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας, δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς εκείνη και είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία μας. Επιπλέον δεν θα μπορούσα να παραλείψω, την Ειρήνη Παπανικολάου, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, την οποία ευχαριστώ για το ενδιαφέρον της, τις χρήσιμες συμβουλές καθώς και τις εύστοχες παρεμβάσεις της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και για τη γενικότερη αρωγή της, σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα ευχαριστήσω βαθύτατα τη μητέρα μου και την αδερφή μου, Ελεάνα και Μαρία, που είναι πάντοτε δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα, με την ανιδιοτελή αγάπη και κατανόησή τους, δίνοντας μου ώθηση να πραγματοποιήσω όλους τους στόχους και τα όνειρα μου.

*Η επιστήμη έχει μεγάλη ομορφιά ...*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι HSP70 ανήκουν στην οικογένεια των μοριακών συνοδών, αποτελούν πρωτεΐνες θερμικού σοκ πανταχού παρούσες σε όλους τους οργανισμούς, και η υπερέκφραση τους επάγεται από ερεθίσματα κυτταρικού στρες. Σε μοριακό επίπεδο εξασφαλίζουν την πρωτεϊνική ομοιόσταση, σε κυτταρικό επίπεδο ελέγχουν διάφορα αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, ενώ σε επίπεδο οργανισμού, συνδέονται με πληθώρα ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων όπως για παράδειγμα ο καρκίνος. Επομένως, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και κατ' επέκταση στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού.

Διάφορες φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, τα οποία εντοπίζονται σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης, εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της έκφρασης της HSP70, γεγονός που τους προσδίδει αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν δύο φλαβονοειδή, η φισετίνη και η μορίνη, με σκοπό την *in vitro* αυτόνομη αλλά και συνδυαστική διερεύνηση της δράσης τους, τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών μυός (NIH/3T3) όσο και σε εμβρυικά κύτταρα μυός τα οποία υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 (Tg/Tg). Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της βιοσυμβατότητας και της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των δύο αυτών φλαβονοειδών, καθώς επίσης και στην εξακρίβωση της κυτταροπροστατευτικής δράσης της HSP70 στα κύτταρα. Ειδικότερα, η πειραματική εφαρμογή των παραπάνω πραγματοποιήθηκε με δοσοεξαρτώμενες και χρονοεξαρτώμενες δοκιμασίες κυτταρικής επιβίωσης αλλά και με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, με σκοπό την ανίχνευση πιθανής παραγωγής ενδοκυτταρικών (ΔΜΟ) αλλά και την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.

Σε όλες τις πειραματικές διεργασίες, τα φυσιολογικά κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίστηκαν πιο ευάλωτα, σε σχέση με τα εμβρυικά κύτταρα μυός που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 (Tg/Tg), έπειτα από την έκθεσή τους στα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στην ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση της HSP70. Παρόλα αυτά, και οι δύο κυτταρικές σειρές, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες στην τοξικότητα της φισετίνης, συγκριτικά με της μορίνης, καθώς η κυτταρική επιβίωση είναι σημαντικά μικρότερη. Επιπρόσθετα, εντονότερη διαφορά στην επιβίωση και στο σχηματισμό αποικιών φαίνεται κατά την έκθεση των κυττάρων στη φισετίνη, όπου τα κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίζονται πιο ευαίσθητα. Και τα δύο φλαβονοειδή δεν δρουν μέσω της παραγωγής ΔΜΟ σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές.

Παρόλα αυτά, μόνο η φισετίνη εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την HSP70, ιδιότητα που την καθιστά ιδανική επιλογή για τη μελέτη του ρόλου της στην αναστολή της δράσης της συγκεκριμένης HSP και στη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών σειρών που



σχετίζονται με αυτή. Εντούτοις, η ανάγκη για διενέργεια περαιτέρω μελετών σχετικά με τα δύο φλαβονοειδή είναι αδιαμφισβήτητη, καθώς χαρακτηριστικά όπως η βιοκατανομή, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης, καθώς και η πιθανή ύπαρξη μεταβολιτών τους, είναι απαραίτητο να διασαφηνιστούν. Επομένως, μέσω περαιτέρω έρευνας και πειραματικών εφαρμογών, μπορεί να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά με ήδη γνωστά αντικαρκινικά, και όχι μόνο, φάρμακα.

## ABSTRACT

HSP70s (Heat Shock Proteins 70) belong to the molecular chaperone family, are ubiquitous heat shock proteins in all organisms, and their overexpression is induced by cellular stress stimuli. At the molecular level, they ensure protein homeostasis, at the cellular level they control various apoptotic signaling pathways, while at the organismal level, they are associated with a multitude of diseases and pathological conditions such as cancer. Therefore, they play an important role in maintaining cellular homeostasis and by extension, in the proper functioning of the body.

Various natural polyphenolic compounds such as flavonoids, which are found in foods and beverages of plant origin, show a significant inhibitory effect against the expression of HSP70, which gives them anti-inflammatory, anti-microbial, anti-mutagenic and anti-cancer properties.

In this present study, two flavonoids, fisetin and morin, were studied, with the aim of in vitro independent and combined investigation of their action, both in normal mice fibroblast cells (NIH/3T3) and in embryonic mice cells that overexpress the human HSP70 (Tg/Tg). More specifically, the study focused on the investigation of the biocompatibility and the potential cytotoxic effect of these two flavonoids, as well as on the determination of the cytoprotective effect of HSP70 on cells. In particular, the experimental application of the above, was carried out with dose-dependent and time-dependent cell survival tests and with the use of flow cytometry, to detect possible intracellular production (ROS) and to analyze the cell cycle. In all experimental processes, normal cells (NIH/3T3) appeared more susceptible, compared to embryonic mice cells that overexpressing human HSP70 (Tg/Tg), after exposure to the two flavonoids, a fact which is probably attributed to the strong cytoprotective effect of HSP70. Nevertheless, both cell lines seem to be more sensitive to fisetin toxicity compared to morin, as cell survival is significantly lower. Additionally, a more pronounced difference in survival and colony formation is seen upon exposure of cells to fisetin, where (NIH/3T3) cells appear more susceptible. Both flavonoids do not act through (ROS) production in either cell line.

In conclusion, only fisetin showed cytotoxicity in cells overexpressing HSP70, a property that makes it an ideal choice to study its role in inhibiting the action of this HSP and reducing the viability of the cancer lines associated with it. Therefore, the need for further studies on the two flavonoids is indisputable, as features such as biodistribution, the exact molecular mechanism of action, as well as the possible existence of their metabolites, need to be clarified. Therefore, through further research and experimental applications, their effectiveness in the treatment of various diseases such as cancer can be ascertained, both individually and in combination with already known anticancer drugs.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AD	Alzheimer Disease	Νόσος Alzheimer
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
CAT	Catalase	Καταλάση
COX	Cyclooxygenase	Κυκλοοξυγενάση
CP	Cell Proliferation	Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός
CV	Cell Viability	Κυτταρική Βιωσιμότητα
DCFDA	Dichlorodihydrofluorescein Diacetate	Διοξεική Διχλωροϋδροφθοροσκεΐνη
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Θρεπτικό Υλικό
DMSO	Dimethylsulfoxid	Διμέθυλοσουλφοξείδιο
DOX	Doxorubicin	Δοξορουβικίνη
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallate	Γαλλική Επιγαλλοκατεχίνη-3
FBS	Fetal Bovine Serum	Εμβρυϊκός Ορός Βοοειδών
FC	Flow Cytometry	Κυτταρομετρία Ροής
GPx	Glutathione Peroxidase	Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης
GRP78	Glucose Regulated Protein 78	Πρωτεΐνη Ρυθμιζόμενη από Γλυκόζη 78
GST	Glutathione S-Transferase	Τρανσφεράση-S της Γλουταθειόνης
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	Ισορροπημένο Αλατούχο Διάλυμα του Hanks
HD	Huntington's Disease	Νόσος του Χάντινγκτον
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1	Μεταγραφικός Παράγοντας Θερμικού Σοκ 1
HSP	Heat Shock Protein	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ
HSP100	Heat Shock Protein 100	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 100
HSP90	Heat Shock Protein 90	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 90
HSP60	Heat Shock Protein 60	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 60
HSP70	Heat Shock Protein 70	Πρωτεΐνη Θερμικού Σοκ 70
IC50	Half-Maximal Inhibitory Concentration	Ημίσεια Μέγιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση
LOX	Lipoxygenase	Λιποξυγενάση
MFI	Mean Fluorescence Intensity	Μέση Ένταση Φθορισμού
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	(βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθιαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο
NBD	Nucleotide Binding Domain	Περιοχή Δέσμευσης Νουκλεοτιδίων
PBS	Phosphate Buffer Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
PD	Parkinson's Disease	Νόσος του Πάρκινσον
PI	Propidium Iodide	Ιωδιούχο Προπίδιο
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase	Φωσφοϊνοσιτιδική 3-Κινάση
PLA2	Phospholipase A2	Φωσφολιπάση A2
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
SBD	Substrate Binding Domain	Περιοχή Δέσμευσης Υποστρώματος
SF	Surviving Fraction	Κλάσμα Επιβίωσης
SmHSPs	Small Heat Shock Proteins	Μικρές Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ
SOD	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική Δισμουτάση
XO	Xanthine Oxidase	Οξειδάση Ξανθίνης

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	5
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b> .....	10
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	13
<b>1.1 Μοριακοί Συνοδοί</b> .....	13
<b>1.1.1 Η οικογένεια των HSP</b> .....	14
<b>1.1.2 HSP60</b> .....	16
<b>1.1.3 HSP90</b> .....	17
<b>1.1.4 HSP100</b> .....	18
<b>1.1.5 SmHSPs</b> .....	18
<b>1.1.6 HSP70</b> .....	19
<b>1.1.6.1 Δομή HSP70</b> .....	20
<b>1.1.6.2 Ανθρώπινες Ισομορφές HSP70</b> .....	21
<b>1.1.6.3 HSP70 και Καρκίνος</b> .....	22
<b>1.1.6.4 HSP70 και Ασθένειες</b> .....	24
<b>1.2 Φλαβονοειδή</b> .....	26
<b>1.2.1 Δομή Φλαβονοειδών</b> .....	27
<b>1.2.2 Ταξινόμηση Φλαβονοειδών</b> .....	28
<b>1.2.2.1 Φλαβόνες</b> .....	29
<b>1.2.2.2 Φλαβονόλες</b> .....	29
<b>1.2.2.3 Φλαβανόνες</b> .....	30
<b>1.2.2.4 Ισοφλαβόνες</b> .....	31
<b>1.2.2.5 Νεοφλαβόνες</b> .....	31
<b>1.2.2.6 Φλαβανόλες ή Κατεχίνες</b> .....	32
<b>1.2.2.7 Ανθοκυανίνες</b> .....	32
<b>1.2.2.8 Χαλκόνες</b> .....	32
<b>1.2.3 Βιολογική Δραστικότητα Φλαβονοειδών</b> .....	33
<b>1.2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση</b> .....	34
<b>1.2.3.2 Αντιφλεγμονώδης Δράση</b> .....	35
<b>1.2.3.3 Αντιμικροβιακή Δράση</b> .....	37
<b>1.2.3.4 Αντικαρκινική Δράση</b> .....	40
<b>1.3 HSP70 και Φλαβονοειδή</b> .....	41
<b>1.3.1 HSP70 και Φισετίνη</b> .....	42

1.3.2 HSP70 και Μορίνη .....	45
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>50</b>
2.1 Κυτταροκαλλιέργεια Κυτταρικών Σειρών .....	50
2.1.1 Κυτταρική Σειρά NIH/3T3.....	50
2.1.2 Κυτταρική Σειρά Tg/Tg .....	51
2.2 Υλικά Κυτταροκαλλιέργειας .....	52
2.2.1 Θρεπτικό Υλικό Κυττάρων .....	53
2.2.2 Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης (PBS).....	53
2.2.3 Ορός (FBS).....	54
2.2.4 Διάλυμα Θρυψίνης/EDTA .....	54
2.2.5 Εξοπλισμός και Όργανα .....	54
2.3 Ανάπτυξη και Διατήρηση Κυττάρων .....	55
2.4 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων .....	56
2.5 Κρυοσυντήρηση και Αποθήκευση Κυττάρων .....	57
2.6 Φισετίνη.....	58
2.7 Μορίνη.....	58
2.8 Εργαστηριακές Πειραματικές Μέθοδοι .....	59
2.8.1 Υλικά Πειραματικών Μεθόδων .....	59
2.8.2 MTT Assay.....	59
2.8.3 Προσδιορισμός Ικανότητας Σχηματισμού Αποικιών (Clonogenic Assay).....	61
2.8.4 Κυτταρομετρία Ροής (KR).....	63
2.8.5 Προσδιορισμός Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) με KR .....	64
2.8.6 Κυτταρικός Κύκλος .....	66
2.9 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων .....	67
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>68</b>
3.1 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT .....	68
3.1.1 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα Tg/Tg.....	68
3.1.2 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα NIH/3T3 .....	75
3.1.3 Σύγκριση Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα Tg/Tg και NIH/3T3 .....	82
3.3 Κυτταρομετρία Ροής (KR).....	94
3.1 Προσδιορισμός Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) με KR.....	94
3.2 Κυτταρικός Κύκλος .....	96
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>99</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>106</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>107</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Μοριακοί Συνοδοί

Οι πρωτεΐνες αποτελούν μακρομόρια ζωτικής σημασίας για όλες τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου. Η επιτυχής εκτέλεση των κυτταρικών διεργασιών εξαρτάται από τις συντονισμένες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Στον ανθρώπινο οργανισμό, υπολογίζεται ότι 20.000 έως 25.000 διαφορετικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τις περισσότερες βιολογικές λειτουργίες. Μετά τη σύνθεση των πρωτεϊνών στα ριβοσώματα, ως γραμμικές αλληλουχίες αμινοξέων, η συντριπτική πλειοψηφία των πρωτεϊνών πρέπει να αναδιπλωθεί σε καλά καθορισμένες τρισδιάστατες δομές ώστε να καταστούν λειτουργικά ενεργές (Kim et al., 2013).

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται βάση πληροφοριών που κωδικοποιούνται στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους (Barral et al., 2004). Στους ζωντανούς οργανισμούς, τα κύτταρα βρίσκονται υπό διαρκώς μεταβαλλόμενες συνθήκες και η διατήρηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών τους, είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την ακεραιότητά τους, καθώς έχει βρεθεί ότι η λανθασμένη αναδίπλωση και η συσσώρευση πρωτεϊνών προκαλεί τη δυσλειτουργία τους και οδηγεί σε διάφορες ασθένειες (Hu et al., 2022).

Επομένως, στο κυτταρικό περιβάλλον οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο λανθασμένης αναδίπλωσης και συσσωμάτωσης, σχηματίζοντας δυνητικά επιβλαβή είδη πρωτεϊνών, οι οποίες ευθύνονται για πληθώρα ασθενειών. Το κύτταρο λοιπόν, για να αποφύγει αυτούς τους κινδύνους, διαθέτει ένα σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνών, γνωστές ως «μοριακοί σύνοδοι», οι οποίοι χρησιμοποιούν πολύπλοκους μηχανισμούς, για να αποτρέπουν τη συσσώρευση των πρωτεϊνών, προωθώντας την αποτελεσματική αναδίπλωση τους (Hart et al., 2011).

Οι μοριακοί συνοδοί ορίζονται ως μια λειτουργική οικογένεια πρωτεϊνών που καθορίζουν τη σωστή μη ομοιοπολική συναρμολόγηση των πολυπεπτιδίων *in vivo*, αλλά δεν αποτελούν συστατικά της τελικής τρισδιάστατης δομής τους (Lund, 2001). Ο ρόλος των μοριακών συνοδών είναι η ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, η διατήρηση της ακεραιότητας του πολυπεπτιδίου και η πρωτεόσταση. Διαταραχές της πρωτεόστασης εμπλέκονται με τη γήρανση αλλά και την παθογένεση πολλών εκφυλιστικών ασθενειών. Επιπλέον, το δίκτυο των μοριακών συνοδών λειτουργεί σε διάφορες πτυχές του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του ξεδιπλώματος αλλά και της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης της πρωτεΐνης, όταν αυτό απαιτείται (Kim et al., 2013). Έτσι, εξασφαλίζεται τόσο η επιτυχής τριτοταγής αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών όσο και η επιδιόρθωση των μετουσιωμένων πολυπεπτιδίων ή η επαγωγή της αποικοδόμησής τους, μετά από έκθεση αυτών, σε καταστάσεις κυτταρικού στρες ή σε κάποιο άλλο βλαπτικό ερέθισμα. Παράλληλα, εκτός από τις λειτουργίες συνοδού,

διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση, στον κυτταρικό κύκλο καθώς και στη ρύθμιση της απόπτωσης, όταν η βλάβη στο πρωτεϊνικό μόριο είναι μη αναστρέψιμη (Hu et al., 2022). Έτσι, οι μοριακοί συνοδοί επάγουν την αποικοδόμηση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών έπειτα από συνθήκες στρες, με την ενεργοποίηση της αποπτωτικής οδού (Shende et al., 2019).

Οι μοριακοί συνοδοί ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες με βάση την ομολογία αλληλουχίας τους. Πολλές είναι πρωτεΐνες στρες ή πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP:Heat Shock Proteins), καθώς η σύνθεσή τους προκαλείται υπό συνθήκες κυτταρικού στρες (π.χ. θερμότητα ή οξειδωτικό στρες), ερεθίσματα τα οποία δομικά αποσταθεροποιούν τις πρωτεΐνες. Η ευρύτερη οικογένεια των μοριακών συνοδών περιλαμβάνει τις παρακάτω υποκατηγορίες των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, οι οποίες ονομάζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος: Hsp40s, Hsp60s, Hsp70s, Hsp90s, Hsp100s και τις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ SmHsps (Kim et al., 2013).

### 1.1.1 Η οικογένεια των HSP

Η οικογένεια των (HSPs) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας εξαιρετικά συντηρημένης εξελικτικά πρωτεϊνικής οικογένειας (Rehman et al., 2020). Οι HSPs είναι άφθονες και εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς και σε όλα τα κύτταρα, είναι δηλαδή παρούσες τόσο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως τα βακτήρια και τα αρχαία, όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Hagymasi et al., 2022). Η σύνθεση των HSPs εμφανίζεται σε όλα τα είδη φυτών και ζώων συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (Candido, 2001).

Υπό κανονικές συνθήκες, οι HSPs αντιπροσωπεύουν το (5-10%) του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών και λειτουργούν ως ένα ολοκληρωμένο δίκτυο για τη διατήρηση της πρωτεόστασης (Hu et al., 2022). Αντίθετα, σε μη φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση τους μπορεί να αυξηθεί σημαντικά ως απόκριση σε τέσσερις τύπους ερεθισμάτων συμπεριλαμβανομένων των φυσικών (π.χ. ακτινοβολία ή θερμικό σοκ), χημικών (π.χ. τοξίνες, ιόντα βαρέων μετάλλων), μικροβιακών (π.χ. παθογόνα βακτήρια, ιοί, παράσιτα και μύκητες), καθώς και διατροφικών ερεθισμάτων (Bolhassani & Agi, 2019). Ειδικότερα, η θερμοκρασία στην οποία επάγονται οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ποικίλλει ανάλογα με τη φυσιολογική θερμοκρασία ανάπτυξης του κάθε είδους. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του ανθρώπου ή του μυός, επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού σοκ, όταν η θερμοκρασία αυξάνεται σε αρκετούς βαθμούς πάνω από την κανονική θερμοκρασία του σώματός τους 37 °C, για παράδειγμα 41–42 °C (Candido, 2001).

Για την οικογένεια HSP70, η πρώτη πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP70 ανακαλύφθηκε τυχαία για πρώτη φορά το 1962 στη μύγα *Drosophila busckii*, όπως αποκαλύφθηκε από το μοτίβο «διογκώματος»

των χρωμοσωμάτων ως απόκριση σε ερεθίσματα θερμότητας και οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η επαγόμενη από το θερμικό σοκ, διόγκωση των χρωμοσωμάτων οφείλεται στη μεταβολή της μεταγραφικής ενεργότητάς τους, λόγω του βλαπτικού ερεθίσματος που υπέστησαν (Ritossa, 1962). Όσον αφορά την προκαρυωτική ομόλογη πρωτεΐνη της HSP70, βρέθηκε τη δεκαετία του 1980, στο βακτήριο *Escherichia coli*, με τη μορφή HSP70-DnaK (Hu et al., 2022).

Μεταξύ των πολλών HSPs, οι οικογένειες HSP60/70/90 αποτελούν τις πιο συχνά μελετημένες πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Παράλληλα, η πρωτεΐνη GroEL, δηλαδή η βακτηριακή ομόλογη της HSP60, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1973 και βρέθηκε να συμμετέχει στη συναρμολόγηση βακτηριοφάγων. Αργότερα, ταυτοποιήθηκαν επίσης ομόλογες πρωτεΐνες της HSP60 σε χλωροπλάστες φυτών καθώς και σε μιτοχόνδρια ζυμομυκήτων. Λίγα χρόνια αργότερα, οι πρωτεΐνες GroEL και GroES (ως ομόλογες της HSP60 και της HSP10 σε προκαρυώτες) αναγνωρίστηκαν ως οι παράγοντες που εκτελούν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών με ATP. Το 1983, το πρώτο γονίδιο της HSP90 απομονώθηκε από ζυμομύκητες και στη συνέχεια αναφέρθηκε ότι η πρωτεΐνη HSP90 σχετίζεται με υποδοχείς στεροειδών (Hu et al., 2022). Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ εντοπίζονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και οργανίδια διαφόρων οργανισμών, όπως στο κυτοσόλιο, στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια, στους χλωροπλάστες, στο ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά και στον πυρήνα (Hu et al., 2022).

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ ταξινομούνται με βάση το μοριακό βάρος τους, σε υποοικογένειες, όπου το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται μεταξύ 8 και 150 kDa. Η ονοματολογία τους καθορίζεται ανάλογα με το μοριακό βάρος, για παράδειγμα, μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 90 kDa ονομάζεται «HSP90» και «hsp90» είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HSP90. Ακολούθως, η οικογένεια των HSPs που χωρίζεται σε έξι υποοικογένειες με βάση μοριακού βάρους και είναι οι HSP100 (100 kDa), HSP90 (90 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP40 (40 kDa) και μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ SmHsps (20–30 kDa) (Shende et al., 2019) (Εικόνα 1.1).





**Εικόνα 1.1:** Συστηματική ταξινόμηση των HSPs με βάση το μοριακό τους βάρος (Shende et al., 2019).

### 1.1.2 HSP60

Οι HSP60 αποτελούν αρκετά συντηρημένες πρωτεΐνες που εκφράζονται σε όλα τα είδη, είναι συνοδοί που ανήκουν στις σαπερονίνες και ονομάζονται αλλιώς και Crh60. Στα κύτταρα εντοπίζονται δύο ομάδες πρωτεϊνών HSP60, οι οποίες εκφράζονται σε διαφορετικές θέσεις. Οι πρωτεΐνες HSP60 της Ομάδας I εκφράζονται σε προκαρυωτικά κύτταρα (γνωστές ως GroEL) και στα ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια ή στους χλωροπλάστες των φυτών, και λειτουργούν με τον συμπαραγόνα HSP10 (GroES σε προκαρυώτες). Αντίθετα, οι πρωτεΐνες HSP60 της Ομάδας II κατανέμονται στα αρχαία και στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Και οι δύο ομάδες σαπερονινών διαθέτουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης, μέσω του οποίου συμμετέχουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Balchin et al., 2018).

Οι HSP60 της Ομάδας I εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια στα οποία, μαζί με τη συν-σαπερονίνη HSP10, εξασφαλίζουν την πρωτεϊνική ομοιοστάση. Εκτός από τον καθορισμένο εντοπισμό τους, οι HSP60 ανευρίσκονται επίσης στο κυτταρόπλασμα, στη πλασματική μεμβράνη, στον εξωκυτταρικό χώρο αλλά και στα σωματικά υγρά. Επομένως, οι λειτουργίες των HSP60 ποικίλλουν ανάλογα, με το περιβάλλον στο οποίο εντοπίζονται. Για παράδειγμα, εντός των μιτοχονδρίων, οι HSP60 συμμετέχουν στην αναδίπλωση και τη μεταφορά άλλων πρωτεϊνών, αλλά στο κυτταρόπλασμα μπορούν να ευνοήσουν την απόπτωση ή το αντίθετο, όπως συμβαίνει σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα, όπου μπορούν να επάγουν ή να καταστείλουν την απόπτωση (Bavisotto et al., 2020).

Οι HSP60 προκαλούν ισχυρή προφλεγμονώδη απόκριση σε κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος και χρησιμεύουν ως σήμα κινδύνου για τα «στρεσαρισμένα» ή κατεστραμμένα κύτταρα. Τέλος, καθώς τα επίπεδα της κυτοσολικής πρωτεΐνης HSP60 σταδιακά αυξάνονται ή μειώνονται κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης σε διάφορα όργανα, η HSP60 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση και την πρόγνωση προνεοπλασματικών και νεοπλασματικών ασθενειών (Nakamura et al., 2013).

### 1.1.3 HSP90

Οι HSP90 είναι εξαιρετικά διατηρημένες πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 kDa. Εκφράζονται παντού σε όλα τα είδη των οργανισμών, εκτός από τα αρχαία (Hu et al., 2022). Οι HSP90 αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της πρωτεόστασης, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες, και εξαρτώνται από το ATP (Schopf et al., 2017). Συγκεκριμένα, φυσιολογικά κυμαίνονται στο 1-2% του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών και αυξάνονται στο 4-6% σε καταστάσεις κυτταρικού στρες (Prodromou, 2016).

Τα ανθρώπινα κύτταρα διαθέτουν δύο κύριες ισομορφές της HSP90 που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, την HSP90β που εντοπίζεται φυσιολογικά στα κύτταρα και την Hsp90α η οποία επάγεται από τη θερμότητα. Αν και οι δύο ισομορφές εμφανίζουν υψηλή ομολογία, οι κυτταρικές τους λειτουργίες δεν είναι πλήρως ταυτόσημες (Oosten-Hawle, 2023).

Οι HSP90 είναι υπεύθυνες για την ωρίμανση των βασικών πρωτεϊνών σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών κινασών, των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και των παραγόντων μεταγραφής (Prodromou, 2016). Κύριες λειτουργίες των HSP90, είναι η συμμετοχή τους σε βασικές κυτταρικές διεργασίες και ρυθμιστικές οδούς όπως η απόπτωση, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η αναδίπλωση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών καθώς και η συμμετοχή τους σε διαδικασίες σηματοδότησης. Επιπλέον, επάγουν την προσαρμοστική ανοσία του οργανισμού με την ενεργοποίηση των αντιγονοπαρουσιαστικών και των δενδριτικών κυττάρων. Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η υπερέκφραση της HSP90 έχει συνδεθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως αρκετούς τύπους καρκίνου, ιογενείς λοιμώξεις, φλεγμονές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο στην παθογένεση πολλών ασθενειών (Hoter et al., 2018). Επομένως, λόγω της σημασίας της στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, οι HSP90 αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο, για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και άλλων νόσων που σχετίζονται με την κακή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Schopf et al., 2017).

#### 1.1.4 HSP100

Οι HSP100, επίσης γνωστές ως πρωτεΐνες Clp, αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών εξαρτώμενες από ATP, οι οποίες διαφέρουν στην τρισδιάστατη δομή και την κυτταρική λειτουργία από άλλους μοριακούς συνοδούς που επάγονται από στρες (Lee et al., 2022). Οι πρωτεΐνες HSP100 εντοπίζονται σε βακτήρια, ζυμομύκητες και πολυκύτταρα φυτά αλλά όχι σε εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς όπως τα ζώα και τους ανθρώπους. Τα βακτήρια και οι ζυμομύκητες διαθέτουν μία ή δύο μορφές των πρωτεϊνών Clp, ενώ τα φυτά διαθέτουν πολλαπλές μορφές αυτών των πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα, ο πυρήνας, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια (Mishra & Grover, 2016). Ενώ η συντριπτική πλειονότητα των μοριακών συνοδών που εξαρτώνται από το ATP προάγουν την αναδίπλωση του νεοσυντιθέμενου πολυπεπτιδίου ώστε να αποκτήσει την τελική του διαμόρφωση, οι HSP100 εκτελούν το αντίστροφο διευκολύνοντας δηλαδή το ξεδίπλωμα ενός λανθασμένα αναδιπλωμένου πολυπεπτιδίου ή αποσυνθέτοντας συσσωματώματα πρωτεϊνών (Lee et al., 2022). Τέλος, οι πρωτεΐνες Clp επειδή δεν εντοπίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό, μπορούν να αποτελέσουν πολλά υποσχόμενους φαρμακευτικούς στόχους για νέα αντιβακτηριακά φάρμακα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό λόγω του αυξανόμενου ρυθμού της ανάπτυξης αντίστασης στα αντιβιοτικά μεταξύ των παθογόνων βακτηρίων, ένα ανησυχητικό πρόβλημα για την παγκόσμια δημόσια υγεία (Kędzierska-Mieszkowska & Zolkiewski 2021).

#### 1.1.5 SmHSPs

Οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (SmHSPs: Small HSPs) ή αλλιώς «πρωτεΐνες θερμικού σοκ β» (HSPBs), αποτελούν μία ετερογενή οικογένεια μοριακών συνοδών, ανεξάρτητες από το ATP, που χαρακτηρίζονται από τα χαμηλά μοριακά τους βάρη (12–43 kDa) και εντοπίζονται σε όλα τα είδη των οργανισμών. Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί περίπου 10 μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ στον πυρήνα του κυτοσολίου των κυττάρων των θηλαστικών (HSPB1–HSPB10) (Hu et al., 2022). Η έκφραση των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ συνδέεται στενά με την ανάπτυξη σε πολλούς οργανισμούς. Οι HSPBs συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων από την απόπτωση, σταθεροποιούν την κυτταροσκελετό και συμβάλλουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης (Morrow & Tanguay, 2012). Επιπλέον, επιδιορθώνουν τις λανθασμένα αναδιπλωμένες και συσσωματωμένες πρωτεΐνες ή συμμετέχουν στην αποικοδόμησή τους, διευκολύνοντας την απομάκρυνση των δυνητικά τοξικών πρωτεϊνών (Tedesco et al., 2022).

Τα αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών HSPBs στο εσωτερικό των κυττάρων παρέχουν προστασία από ένα πλήθος καταστάσεων κυτταρικού στρες. Αντίστροφα, η μείωση των επιπέδων HSPBs ή η απώλεια της λειτουργικότητάς τους λόγω μεταλλάξεων, γενικά ενισχύει την ευαισθησία των κυττάρων στο στρες και μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες (Kampinga & Garrido, 2012). Εκτός από τον ενδοκυτταρικό τους ρόλο, τα μέλη των HSPBs έχουν επίσης ανιχνευθεί και εξωκυτταρικά σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπου η εξωκυτταρική εύρεση τους αποτελεί αποτέλεσμα διαρροής από νεκρά κύτταρα. Μόλις οι HSPBs βρεθούν στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, μπορούν να εκτελούν δύο τουλάχιστον λειτουργίες. Πρώτον, εάν οι πρωτεΐνες εξωκυτταρικά είναι άθικτες, μπορεί ακόμα να είναι σε θέση να λειτουργούν ως συνοδοί που δεσμεύουν π.χ. εξωκυτταρικά συσσωματώματα πρωτεϊνών και να τα αποσυνθέτουν. Δεύτερον, εκτελούν ανοσορυθμιστικές λειτουργίες, πυροδοτώντας γενικά έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις, διαθέτοντας επίσης και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τέλος, μεταλλάξεις σε πολλά μέλη των HSPBs προκαλούν πρόωρο εκφυλισμό μυϊκών ή νευρικών ιστών, ενώ αντίστροφα, η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων σε διαφορετικές αντικαρκινικές θεραπείες σχετίζεται με την αυξημένη έκφραση αρκετών HSPBs (Kampinga & Garrido, 2012).

### 1.1.6 HSP70

Οι HSP70 ή αλλιώς HSP70A1A, είναι πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακό βάρος, περίπου 70 kDa, που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην πρωτεόσταση (Murphy, 2013). Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP70 εντοπίζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, δηλαδή τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως τα βακτήρια, τα φυτά αλλά και τους ανθρώπους (Sharma & Masison, 2009). Στους περισσότερους οργανισμούς, ανευρίσκεται τουλάχιστον μία πρωτεΐνη HSP70, συμπεριλαμβανομένων και των αρχαιοβακτηρίων, αν και οι περισσότεροι οργανισμοί διαθέτουν περισσότερες ισομορφές της HSP70 (Murphy, 2013). Η ανθρώπινη πρωτεΐνη HSP70 και η βακτηριακή ομόλογή της DnaK χαρακτηρίζονται από 50% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων τους (Murphy, 2013). Επιπλέον, οι συνοδοί HSP70 συνεργάζονται με άλλους μοριακούς συνοδούς, συμπεριλαμβανομένων των HSP100, HSP90, HSP60, και SmHSP (Rosenzweig et al., 2019), σχηματίζοντας υποσυστήματα πρωτεόστασης τα οποία αντιμετωπίζουν τις βλάβες των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια τόσο των φυσιολογικών συνθηκών αλλά και των καταστάσεων στρες (Kohler & Andréasson, 2020).

Η έκφραση της HSP70, εξαρτάται από την ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα, και συγκεκριμένα του μεταγραφικού παράγοντα θερμικού σοκ 1 (HSF1: Heat Shock Transcription

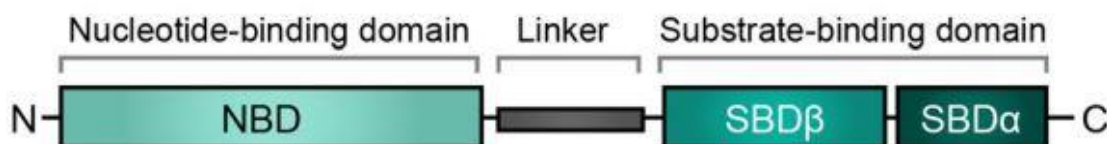
Factor 1). Σε διάφορες συνθήκες κυτταρικού στρες όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, προκαλείται η ενεργοποίηση του HSF1, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου της HSP70, επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου και κατ' επέκταση την παραγωγή της HSP70. Ο HSF1 σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ έπειτα από στρεσογόνα ερεθίσματα, μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και συνδέεται με τους υποκινητές της HSP70 (Xing et al., 2004). Άλλα ερεθίσματα που επάγουν την παραγωγή των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι διάφορα στρεσογόνα κυτταρικά ερεθίσματα όπως η αυξημένη θερμοκρασία, οι συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, το οξειδωτικό στρες, διαταραχές του pH καθώς και η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (Murphy, 2013). Σε μοριακό επίπεδο, οι HSP70 δρουν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση και στην αποικοδόμηση καθώς και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του μονόκλωνου DNA, τόσο στον πυρήνα όσο και στον πυρηνίσκο. Σε κυτταρικό επίπεδο, σχετίζονται με την κυτταρική βιωσιμότητα καθώς και με αποπτωτικούς μηχανισμούς. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να σημειωθεί, πως οι HSP70 χαρακτηρίζονται από θερμοανθεκτικότητα, προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από θερμοκρασίες επιβλαβείς για αυτό (Angelidis et al., 1991). Τέλος, σε επίπεδο οργανισμού, οι HSP70 έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές ασθένειες (Kasioumi et al., 2019).

#### 1.1.6.1 Δομή HSP70

Δεδομένου ότι οι HSP70 των βακτηρίων και των θηλαστικών εμφανίζουν 50% ομοιότητα και διαθέτουν παρόμοιες ενζυμικές λειτουργίες, πιστεύεται πως οι HSP70 σε όλα τα είδη δρουν βάση παρόμοιων μηχανισμών (Sharma & Masison, 2009). Δομικά οι HSP70 διαθέτουν μια εξαιρετικά συντηρημένη κατασκευή που περιλαμβάνει δύο κύριες περιοχές (Εικόνα 1.2). Η πρώτη δομική περιοχή είναι μία N-τερματική περιοχή δέσμησης νουκλεοτιδίων, με μοριακό βάρος περίπου 44kDa, η (NBD: Nucleotide Binding Domain), η οποία εμφανίζει δραστηριότητα ATPάσης και είναι εξαιρετικά συντηρημένη. Ρόλος της είναι η πρόσδεση και η υδρόλυση του ATP (Sharma & Masison, 2009). Έπειτα, ακολουθεί η δεύτερη δομική περιοχή, μία περιοχή δέσμησης υποστρώματος δηλαδή των πεπτιδίων-στόχων, με μοριακό βάρος περίπου 18 kDa, η (SBD: Substrate Binding Domain), η οποία αλληλεπιδρά με τμήματα των υδρόφοβων αμινοξέων στα πεπτίδια, και φέρει μία C-τερματική περιοχή, με μοριακό βάρος περίπου 10 kDa, που σχηματίζει μια δομή σαν «καπάκι» και βοηθά στην παγίδευση της πρωτεΐνης στην περιοχή δέσμησης του υποστρώματος SBD (Sharma & Masison, 2009). Αυτές οι δύο δομικές περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο συνδέτη.

Η περιοχή NBD διαιρείται σε δύο λοβούς (I και II) και διαχωρίζεται από μία αύλακα, η οποία αποτελεί περιοχή δέσμησης του ATP. Οι δύο αυτοί λοβοί διαιρούνται περαιτέρω, σε υποτομείς A και B σχηματίζοντας έτσι τέσσερις υποτομείς, (IA, IB, IIA, IIB), οι οποίοι περιβάλλουν την περιοχή δέσμησης του ATP (Kim et al., 2013). Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η περιοχή SBD διαιρείται σε δύο υπομονάδες, ένα β-πτυχωτό φύλλο (SBDβ), και μια C-τελική υπομονάδα με δομή α-έλικας (SBDα), οι οποίες και δρουν συνεργατικά ως περιοχές δέσμησης του πρωτεϊνικού υποστρώματος (Kohler & Andréasson 2020). Τέλος, οι κυτοσολικές HSP70 των ανώτερων οργανισμών διαθέτουν στο C-τελικό άκρο τους, ένα ρυθμιστικό μοτίβο αμινοξέων (EEVD: Glutamic acid - Glutamic acid - Valine - Aspartic acid) ή (Γλουταμινικό οξύ-Γλουταμινικό οξύ-Βαλίνη Ασπαρτικό οξύ), το οποίο εξυπηρετεί την πρόσδεση διαφόρων συμπαραγόντων όπως οι πρωτεΐνες HSP90 (Ambrose & Charman, 2021).

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης των HSP70, βασίζεται στη δέσμηση και την απελευθέρωση της πρωτεΐνης - υποστρώματος, λειτουργίες που ρυθμίζονται αλλοστερικά με την υδρόλυση του ATP. Στην κατάσταση δέσμησης ATP, η HSP70 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του υποστρώματος επιτρέποντας την απελευθέρωσή του. Τέλος, κατά την υδρόλυση του ATP σε ADP, η HSP70 υφίσταται δομικές αναδιατάξεις, με αποτέλεσμα την παγίδευση του υποστρώματος εντός του SBD (Larburu et al., 2020).



**Εικόνα 1.2:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι δομικές περιοχές της HSP70 (Larburu et al., 2020).

### 1.1.6.2 Ανθρώπινες Ισομορφές HSP70

Στους ανθρώπους, η οικογένεια των HSP70 αποτελείται από 13 ισομορφές που διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων, το επίπεδο έκφρασης στους ιστούς καθώς το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζονται. Κάποιες από αυτές, εκφράζονται φυσιολογικά στα κύτταρα ενώ άλλες επάγονται από διάφορους βλαπτικούς παράγοντες, ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα κυτταρικού στρες (Grassi et al., 2022). Όσον αφορά την ταξινόμησή τους, οι HSP70 διακρίνονται δομικά σε «κανονικές» (canonical) και «μη κανονικές» (noncanonical) (Εικόνα 1.3). Οι «κανονικές» HSP70 διαθέτουν και τις τρεις δομικές περιοχές που αναφέρονται παραπάνω, δηλαδή, την περιοχή δέσμησης υποστρώματος (SBD), την περιοχή δέσμησης νουκλεοτιδίων (NBD) καθώς

και τον συνδέτη. Αντίθετα, οι «μη κανονικές» HSP70 διαθέτουν, την περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD), άλλα στερούνται μία από τις υπόλοιπες δύο δομικές περιοχές. Στις ανθρώπινες 13 ισομορφές των HSP70, οκτώ από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των «κανονικών», ενώ οι υπόλοιπες πέντε στην κατηγορία των «μη κανονικών» (Ambrose et al., 2021). Τέλος, πειραματικά δεδομένα ηλεκτροφόρησης και ανοσοσαποτύπωσης της HSP70 διαγονιδιακών μυών, αποδεικνύουν πως η ανθρώπινη HSP70 υπερεκφράζεται σε διάφορους ιστούς οργάνων, όπως οι πνεύμονες, η καρδιά, οι νεφροί αλλά και ο εγκέφαλος (Angelidis et al., 1996) και (Plumier et al., 1995).

Γονίδιο	Κανονική	Μοτίβο EEVD	Εντοπισμός	Θερμικά Επαγόμενη
HspA1A	Ναι	Ναι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	Ναι
HspA1L	Ναι	Ναι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	Όχι
HspA2	Ναι	Ναι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	Όχι
HspA5	Ναι	Όχι	ενδοπλασματικό δίκτυο	Ναι
HspA6	Ναι	Ναι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	Ναι
HspA8	Ναι	Ναι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	Όχι
HspA9	Ναι	Όχι	μιτοχόνδρια	Όχι
HspA7	Όχι	Όχι	-	-
Hsp12A	Όχι	Όχι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	-
Hsp12B	Όχι	Όχι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	-
HspA13	Όχι	Όχι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	-
HspA14	Όχι	Όχι	κυτταρόπλασμα/πυρήνας	-

**Εικόνα 1.3:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι ανθρώπινες ισομορφές HSP70 (Ambrose et al., 2021).

### 1.1.6.3 HSP70 και Καρκίνος

Στα φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, σε συνθήκες χωρίς στρες, η έκφραση των HSP70 είναι συνήθως πολύ χαμηλή. Αντίθετα, η υψηλή έκφραση της HSP70 αποτελεί ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων και είναι απαραίτητη για την επιβίωση τους (Boudesco et al., 2018). Η HSP70, βρίσκεται σε αφθονία στα καρκινικά κύτταρα, καταστέλλοντας την απόπτωση και επιτρέποντας έτσι στον καρκίνο να επεκταθεί (Albakova et al. 2020). Σε πολλές κακοήθειες, διάφορα είδη των HSPs συχνά υπερεκφράζονται και συνδέονται με κακή πρόγνωση, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του πνεύμονα, του στομάχου, του μαστού, του προστάτη καθώς και των λευχαιμιών. Οι

HSPs έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση και την καρκινική διήθηση. Για παράδειγμα, σε αιματολογικούς καρκίνους όπως σε λευχαιμίες, τόσο τα κύτταρα της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας όσο και της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας αποδείχθηκαν ότι υπερεκφράζουν την HSP70. Επίσης, βρέθηκε πως η υψηλή έκφραση της HSP70, στον καρκίνο του μαστού, συνδέεται με μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες (Hu et al., 2022). Στο παράδειγμα της λευχαιμίας, η έκφραση της HSP70 αυξάνεται στα αιμοσφαίρια ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ενώ η καταστολή της, θα μπορούσε να καταστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να οδηγήσει στην απόπτωση. Παράλληλα, ασθενείς με χαμηλότερη έκφραση HSPs έχουν συνήθως υψηλότερο ποσοστό πλήρους ύφεσης και η συνολική επιβίωσή τους είναι σημαντικά μεγαλύτερη (Hu et al., 2022). Βάση των παραπάνω καθίσταται αντιληπτό πως η HSP70 μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοδείκτη για την πρόγνωση και την μετάσταση του καρκίνου, όπως στο παράδειγμα της επιθηλιακής δυσπλασίας, όπου η πυρηνική συσσώρευση της HSP70, αποτελεί αντικειμενικό προγνωστικό δείκτη μεταστατικής εξάπλωσης, ενώ στο παράδειγμα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, τα αντισώματα έναντι της HSP70 στον ορό των ασθενών, έχουν χαρακτηριστεί ως αξιόπιστος διαγνωστικός δείκτης (Boudesco et al., 2018). Είναι σημαντικό να επισημανθεί πως υπάρχουν δύο κατηγορίες της HSP70 που εντοπίζονται στον ορό των ασθενών με καρκίνο. Η πρώτη κατηγορία είναι η εξωσωματική HSP70, που απελευθερώνεται από ζωντανά καρκινικά κύτταρα, ενώ η δεύτερη κατηγορία είναι η HSP70 που απελευθερώνεται από τα νεκρά καρκινικά κύτταρα (Albakova et al., 2020). Παρόλα αυτά, αν και η υπερέκφραση της HSP70, πιστεύεται πως ευνοεί τις προκαρκινικές συνθήκες ανάπτυξης στα κύτταρα, επομένως η ύπαρξη της ευνοεί την εξέλιξη ορισμένων τύπων καρκίνου, δεν υπάρχουν προς το παρόν ερευνητικά δεδομένα που να αποδεικνύουν πως προκαλεί καρκίνο η ίδια (Kasioumi et al., 2019).

Η έκφραση της HSP70 αυξάνεται περαιτέρω μετά την αντικαρκινική θεραπεία και λόγω των ισχυρών κυτταροπροστατευτικών ιδιοτήτων της, η ποσότητα της κυτταρικής αυτής πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί αντιστρόφως με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επομένως, HSP70 έχει χαρακτηριστεί ως αρνητικός παράγοντας πρόγνωσης, λόγω της αντίστασης των κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, και έτσι όσο υψηλότερα είναι τα ποσοστά της στα κύτταρα, τόσο δυσχερέστερη είναι η πρόγνωση. Βάση των παραπάνω, η εξάντληση της HSP70 ή η παρουσία αναστολέων της, έχουν χημειοευαισθητοποιητικές ιδιότητες και μπορεί ακόμη και να θανατώσουν τα καρκινικά κύτταρα (Boudesco et al., 2018). Έτσι, εξάγεται το συμπέρασμα πως η στόχευση της HSP70 αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η γονιδιακή μεταγραφή της HSP70 ρυθμίζεται από τον παράγοντα μεταγραφής HSF1, ο οποίος ενεργοποιείται ως απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα.



Εφόσον ο ενεργοποιημένος HSF1 επάγει την έκφραση της HSP70, η αναστολή του παράγοντα αυτού, θα μπορούσε να αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για τον περιορισμό της έκφρασης της HSP70. Τέλος, η αναστολής της ενεργοποίησης του HSF1, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως ένα φλαβονοειδές, για παράδειγμα την κερσετίνη (Kumar et al., 2016).

#### 1.1.6.4 HSP70 και Ασθένειες

Οι μοριακοί σύνοδοι έχουν αποδειχθεί πως εμπλέκονται για πολλές πτυχές της ανθρώπινης υγείας καθώς και πληθώρας ανθρώπινων διαταραχών και ασθενειών. Η οικογένεια των πρωτεϊνικών συνοδών 70 καθώς και άλλων μοριακών συνοδών, έχουν μελετηθεί εκτενώς σε θέματα που αφορούν τη βιολογία του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των αυτοάνοσων νοσημάτων και του νευροεκφυλισμού (Duncan et al., 2015). Χαρακτηριστικά παραδείγματα νοσημάτων που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία της HSP70, είναι τα παρακάτω. Πρώτο παράδειγμα νευροεκφυλιστικής διαταραχής, με συμμετοχή της HSP70, αποτελεί η νόσος Alzheimer. Ειδικότερα, η νόσος Alzheimer (AD: Alzheimer Disease), αποτελεί την πιο διαδεδομένη νευροεκφυλιστική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από ανώμαλες συσσωρεύσεις υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης «tau», οι οποίες σχηματίζουν τους νευροϊνδιακούς σωρούς, αλλά και από τις εναποθέσεις λανθασμένα αναδιπλωμένων πεπτιδίων β-αμυλοειδούς (Αβ), τα οποία εντοπίζονται είτε σε μορφή ολιγομερών και είναι διαλυτά, είτε σε μορφή πλακών αμυλοειδούς, που είναι αδιάλυτες (Lackie et al., 2017). Η HSP70 αποτελεί βασικό παράγοντα στη διατήρηση της φυσιολογικής πρωτεΐνης «tau», παρεμποδίζοντας την ανώμαλη φωσφορυλίωση της, καθώς και τη συσσώρευση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πεπτιδίων β-αμυλοειδούς (Αβ). Πιο συγκεκριμένα, η HSP70 δρα μέσω τριών μηχανισμών: αναστέλλει τη συσσώρευση της πρωτεΐνης «tau» και των πεπτιδίων β-αμυλοειδούς (Αβ), καταλύει την μετατροπή της πρωτεΐνης «tau» σε δομή μικροσωληνίσκων, και επιταχύνει την κάθαρση των πλακών αμυλοειδούς (Αβ). Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer, οι νευροπροστατευτικές ιδιότητες των HSP70, είναι αρκετά μειωμένες συγκριτικά με υγιείς ανθρώπους. Άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές που έχουν συσχετιστεί με την HSP70, είναι η νόσος του Πάρκινσον (PD: Parkinson's Disease) και η Νόσος του Huntington (HD: Huntington's Disease) (Hu et al., 2022).

Δεύτερο παράδειγμα ασθενειών, με συμμετοχή της HSP70, αποτελούν οι καρδιαγγειακές νόσοι. Συγκεκριμένα, η HSP70 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της αρτηριακής υπέρτασης, καθώς η αύξηση της αρτηριακής πίεσης, αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα που

διεγείρει την παραγωγή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν πως τα επίπεδα των ισόμορφων της HSP70, είναι αυξημένα στην κυκλοφορία και στους νεφρούς των υπερτασικών ασθενών. Ειδικότερα, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της αρτηριακής πίεσης και της έκφρασης της HSP70 με ευρήματα να αποδεικνύουν την προστατευτική της δράση έναντι της υπέρτασης. Επομένως, η πιθανότητα παρέμβασης στην απόκριση της HSP70 θα πρέπει να θεωρείται πιθανή θεραπευτική στρατηγική στην πρωτοπαθή υπέρταση (Rodriguez et al., 2023). Επίσης η έκφραση της HSP70 στο μυοκάρδιο, έχει ανιχνευθεί σε ανατομική περιοχή όπου έχει προηγηθεί έμφραγμα, με την HSP70 να προάγει την ανάκτηση της συστολής του μυοκαρδίου. Αυτό υποδηλώνει ότι η HSP70 εμφανίζει θετικά αποτελέσματα στην προστασία του μυοκαρδίου και δρα ως βιοδείκτης στρες ή τραυματισμού των καρδιακών κυττάρων (Delogu et al., 2002). Επιπλέον, η υψηλή έκφραση της HSP70 στον καρδιακό ιστό, έχει βρεθεί πως μπορεί να αυξήσει την ανοχή των κυττάρων του μυοκαρδίου στην ισχαιμία, προστατεύοντας τα μυοκαρδιακά κύτταρα από το ισχαιμικό σοκ (Angelidis et al., 1999) και (Plumier et al., 1995), υποδηλώνοντας την υψηλή καρδιοπροστατευτική δράση της HSP70, τόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας όσο και σε καταστάσεις επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου (Hu et al., 2022). Σε μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας προκαλούμενο από δοξορουβικίνη (DOX: Doxorubicin), η υπερέκφραση της HSP70 σε διαγονιδιακούς μύες (Tg/Tg), περιόρισε σημαντικά τις προκαλούμενες βλάβες του μυοκαρδίου, μέσω ενός μηχανισμού αναστολής της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53, μειώνοντας έτσι κατ' επέκταση, την απώλεια των μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω της απόπτωσης (Naka K, K. et al., 2014). Παράλληλα, σε ανάλογη μελέτη της έκφρασης της HSP70 στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια προκαλούμενη από δοξορουβικίνη, σε κλινικό επίπεδο, τα αποτελέσματά έδειξαν πως στην καρδιακή ανεπάρκεια, η συγκέντρωση της HSP70 ήταν αυξημένη στον ορό αίματος των ασθενών συγκριτικά με των υγιών ατόμων. Η υπερέκφραση της HSP70 στον ορό ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια, φάνηκε να σχετίζεται με διάφορα χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, την ηλικία και τον τύπο της καρδιακής ανεπάρκειας, αλλά όχι με την αιτιολογία της νόσου. Επομένως, η HSP70 φαίνεται να ασκεί μια πολύ σημαντική καρδιοπροστατευτική δράση και καθιστά τα κύτταρα του μυοκαρδίου πιο ανθεκτικά στις βλαβερές επιδράσεις της δοξορουβικίνης (Zerikiotis, S. et al., 2019). Όσον αφορά τα αυτοάνοσα νοσήματα και την HSP70, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο διαβήτης. Σε υπεργλυκαιμία που εμφανίζεται στο διαβήτη, επάγεται η υψηλή έκφραση της HSP70 και γενικότερα, η εξέλιξη του διαβήτη σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων της HSP70 στην κυκλοφορία. Βάση βιβλιογραφίας, φαίνεται να υπάρχει μείωση του ρυθμού έκφρασης της HSP70 στους σκελετικούς μύες, στο ήπαρ, και στα αγγεία των διαβητικών ατόμων, ενώ αντίθετα οι νεφροί εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, οι διαβητικοί νεφροί εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα HSP70, λόγω της βλάβης που προκαλείται από την

υπεργλυκαιμία σε αυτά τα όργανα. Έτσι, η HSP70 απεκκρίνεται στα ούρα με μεγαλύτερο ρυθμό ειδικά σε νεαρούς διαβητικούς ασθενείς. Αντίστοιχα, σε άλλα ανθρώπινα όργανα όπως οι οφθαλμοί, ο διαβήτης αυξάνει τη συνολική ποσότητα της HSP70. Επομένως, τα κυκλοφορούντα επίπεδα της HSP70 όχι μόνο αυξάνονται κατά τη διάρκεια του διαβήτη και επιδεινώνονται από την παχυσαρκία, αλλά επίσης συσχετίζονται με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και τη λεπτίνη, δύο σημαντικούς παράγοντες που προκαλούν αντίσταση στην ινσουλίνη (Oliveira et al., 2022).

## 1.2 Φλαβονοειδή

Φλαβονοειδή ονομάζονται, μία ομάδα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών με πολυφαινολική δομή, που εντοπίζονται σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης, όπως σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, τσάι, κακάο και κρασί, αλλά και σε μίσχους ή άνθη φυτών (Panche et al., 2016). Οι πρώτες αναφορές για φλαβονοειδή πραγματοποιήθηκαν το 1930, αναφέροντας μια νέα ουσία η οποία απομονώθηκε από τα πορτοκάλια, όπου εκείνη την εποχή πιστευόταν ότι ήταν μέλος μιας νέας κατηγορίας βιταμινών και χαρακτηρίστηκε ως βιταμίνη P. Αργότερα βέβαια, έγινε σαφές ότι αυτή η ουσία ήταν φλαβονοειδές, και συγκεκριμένα η ρουτίνη (Middleton, 1998). Επί του παρόντος έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 8.000 φλαβονοειδή, τα οποία εντοπίζονται στις πολύχρωμες χρωστικές των φρούτων, των βοτάνων, των λαχανικών και των φαρμακευτικών φυτών (Cui et al., 2016). Αυτά τα φυσικά προϊόντα είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου, και θεωρούνται πλέον απαραίτητο συστατικό σε μια ποικιλία διατροφικών, φαρμακευτικών, θεραπευτικών και καλλυντικών εφαρμογών. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός πως τα φλαβονοειδή διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες αλλά και την ικανότητά να ρυθμίζουν τη λειτουργία των βασικών κυτταρικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, αποτελούν ισχυρούς αναστολείς για διάφορα οξειδωτικά ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η κυκλοοξυγενάση, η λιποξυγενάση και η φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάση (Panche et al., 2016).

Τα φλαβονοειδή διαδραματίζουν μια ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων σε φυτά, ζώα και βακτήρια. Στη φύση, τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, είναι προϊόντα που εξάγονται από φυτά και τα οποία βρίσκονται σε πολλά μέρη του φυτού, αποτελώντας μια από τις πιο χαρακτηριστικές κατηγορίες ενώσεων στα ανώτερα φυτά. Πολλά φλαβονοειδή αποτελούν χρωστικές λουλουδιών στις περισσότερες οικογένειες αγγειόσπερμων (Samanta et al., 2011). Συντίθενται σε συγκεκριμένα μέρη του φυτού, και είναι υπεύθυνα για το χρώμα, το άρωμα των λουλουδιών, ενώ στους καρπούς για την προσέλκυση των επικονιαστών και

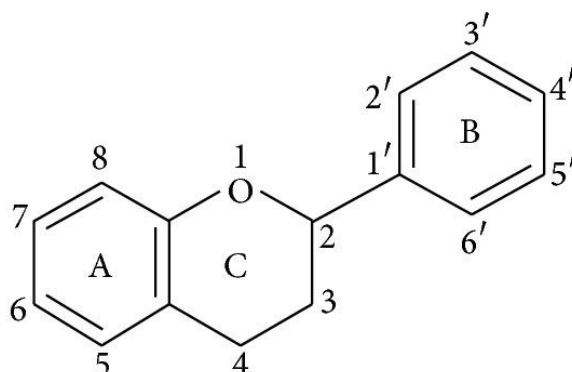
κατά συνέπεια τη διασπορά των καρπών ώστε να βοηθηθεί η βλάστηση του φυτού. Ωστόσο, ο εντοπισμός τους δεν περιορίζεται μόνο στα άνθη αλλά μπορεί να βρίσκονται και σε όλα τα μέρη των φυτών όπως αναφέρεται και παραπάνω. Επιπλέον, οι κύριες λειτουργίες των φλαβονοειδών στα φυτά, είναι η προστασία των φυτών από διαφορετικές βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η λειτουργία τους ως φίλτρα της βλαπτικής ακτινοβολίας UV, ως αποτοξινωτικοί παράγοντες αλλά και αντιμικροβιακές ενώσεις. Επιπλέον, σχετίζονται με τη προστασία των φυτών από τον παγετό, την αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας και υποβοηθούν το θερμικό εγκλιματισμό τους, σε συνθήκες εναλλαγής της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος (Samanta et al., 2011).

Παρόλα αυτά, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί πλήρως. Ωστόσο, είναι ευρέως γνωστό εδώ και αιώνες, πως τα παράγωγα φυτικής προέλευσης διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικής δραστηριότητας. Οι τρέχουσες τάσεις των δραστηριοτήτων έρευνας και ανάπτυξης που αφορούν τα φλαβονοειδή σχετίζονται με την απομόνωση, την ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό και τις λειτουργίες των φλαβονοειδών, σε εφαρμογές τους για όφελος της υγείας. Τέλος, η δράση των φλαβονοειδών έχει συσχετιστεί θετικά με διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η νόσος του Alzheimer, και η αθηροσκλήρωση (Panche et al., 2016).

### 1.2.1 Δομή Φλαβονοειδών

Όλα τα φλαβονοειδή, δομούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα στον βασικό τους ανθρακικό σκελετό, τα οποία διατάσσονται σε δύο αρωματικούς δακτυλίους με έξι άτομα άνθρακα (A και B), οι οποίοι συνδέονται με μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα (Εικόνα 1.4). Η αλυσίδα αυτή, σχηματίζει έναν κλειστό δακτύλιο πυρανίου (ετεροκυκλικός πυρολικός δακτύλιος άνθρακα που περιέχει οξυγόνο), ο δακτύλιος (C). Αυτή η δομή των τριών ατόμων άνθρακα που γεφυρώνει τους δύο δακτυλίους, συνήθως κυκλοποιείται με οξυγόνο σχηματίζοντας έναν τρίτο δακτύλιο (Ramesh et al., 2021). Επομένως, σχεδόν όλα τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν μια δομή C6-C3-C6 η οποία περιέχει δύο δακτυλίους βενζολίου, τον A και τον B, που συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρενίου (C) που περιέχει οξυγόνο. Η βιολογική αντιοξειδωτική δράση κάθε φλαβονοειδούς σχετίζεται άμεσα με την χημική του δομή (Dias et al., 2021). Τα περισσότερα φλαβονοειδή συναντώνται ως αγλυκόνες, γλυκοσίδες και μεθυλιωμένα παράγωγα. Ειδικότερα, σάκχαρα συνδέονται με υδροξυλικές ομάδες, συνήθως με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου. Έτσι, το σάκχαρο με το οποίο είναι συνδεδεμένο το φλαβονοειδές καθορίζει και τις ιδιότητές του. Κατά τον σχηματισμό των γλυκοσίδων, ο γλυκοζιτικός δεσμός σχηματίζεται στην θέση 3 ή 7 του υδατανθρακικού τμήματος,

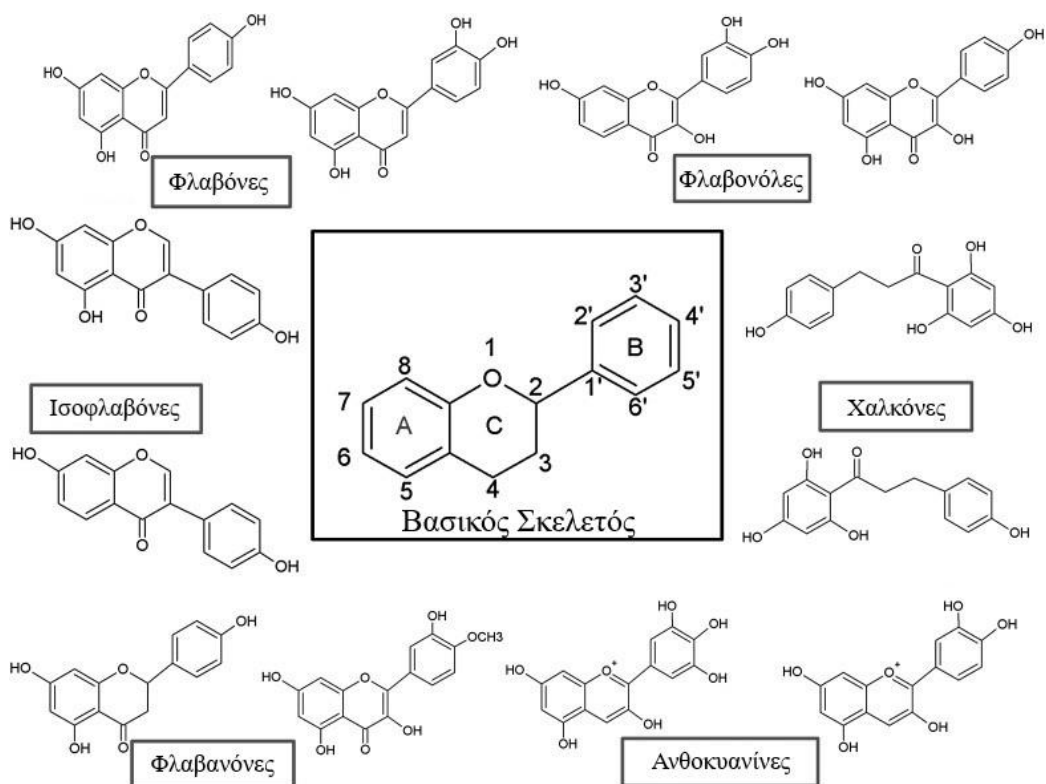
ενώ στη γλυκοσιδική σύνδεση, ο υδατάνθρακας που συμμετέχει μπορεί να είναι L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, γλυκοραμνόζη, γαλακτόζη ή αραβινόζη (Kumar & Pandey, 2013).



**Εικόνα 1.4:** Στην εικόνα απεικονίζεται η βασική δομή των φλαβονοειδών ((Kumar & Pandey, 2013).

### 1.2.2 Ταξινόμηση Φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή κατατάσσονται σε διαφορετικές υποομάδες, βάση της θέσης του ανθρακικού δακτυλίου (C), στον οποίο είναι συνδεδεμένος ο βενζολικός δακτύλιος (B), καθώς και το βαθμό ακορευστότητας, το βαθμό οξείδωσης και το είδος των υποκαταστατών του δακτυλίου (C). Έτσι, τα φλαβονοειδή στα οποία ο βενζολικός δακτύλιος (B) είναι συνδεδεμένος στη θέση 3 του δακτυλίου (C) ονομάζονται ισοφλαβόνες. Αντίστοιχα, τα φλαβονοειδή στα οποία ο βενζολικός δακτύλιος (B) εντοπίζεται στη θέση 4 του δακτυλίου (C), ονομάζονται νεοφλαβονοειδή, ενώ εκείνα στα οποία ο βενζολικός δακτύλιος (B) είναι συνδεδεμένος στη θέση 2 του δακτυλίου (C), μπορούν επιπλέον να διαιρεθούν σε πολλές υποκατηγορίες, βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου (C). Αυτές οι υποκατηγορίες είναι: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες (Ranche et al., 2016). Ειδικότερα, περισσότερα δεδομένα σχετικά με τις υποκατηγορίες των φλαβονοειδών παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 1.5).



**Εικόνα 1.5:** Στην εικόνα απεικονίζεται η βασική δομή του σκελετού των φλαβονοειδών και οι κατηγορίες τους (Panche et al., 2016).

### 1.2.2.1 Φλαβόνες

Οι φλαβόνες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες και μεγαλύτερες υποομάδες φλαβονοειδών. Εντοπίζονται ευρέως στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς των φυτών ως γλυκοζίτες. Το σέλινο, ο μαϊντανός, οι κόκκινες πιπεριές, το χαμομήλι, ο φλοιός των εσπεριδοειδών και η μέντα αποτελούν τις κυριότερες πηγές φλαβονών. Η λουτεολίνη (luteolin), η απιγενίνη (apigenin) και η τανγκεριτίνη (tangeritin) ανήκουν σε αυτή την υποκατηγορία φλαβονοειδών. Όσον αφορά τη δομή τους, διαθέτουν διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων 2 και 3 και μια κετόνη στη θέση 4 του δακτυλίου (C) (Panche et al., 2016).

### 1.2.2.2 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες ή 3-υδροξυφλαβόνες, αποτελούν δομικά στοιχεία των προανθοκυανινών. Οι φλαβονόλες εντοπίζονται σε αφθονία σε μια ποικιλία φρούτων και λαχανικών όπως τα κρεμμύδια, το λάχανο, το μαρούλι, οι ντομάτες, τα μήλα, τα σταφύλια καθώς και τα μούρα. Εκτός από τα

φρούτα και τα λαχανικά, το τσάι και το κόκκινο κρασί αποτελούν επίσης πηγές φλαβονολών. Ανάμεσα στις φλαβονόλες που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι η καμπφερόλη (kaempferol), η κερσετίνη (quercetin), η μυρικετίνη (myricetin) και η φισετίνη η (fisetin). Συγκριτικά με τις φλαβόνες, οι φλαβονόλες έχουν μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου (C) (Panche et al., 2016). Δομικά, χαρακτηρίζονται από αρκετές ειδικές υποκαταστάσεις στους δακτυλίους A και B, οι οποίοι συνδέονται με μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Οι θέσεις 5 και 7 στο βενζολικό δακτύλιο (A) των φλαβονολών, αντικαθίστανται με υδροξυλομάδες, έτσι διαθέτουν τρεις ομάδες υδροξυλίου αντίθετα με άλλα φλαβονοειδή. Οι φλαβονόλες εντοπίζονται στα επιδερμικά κύτταρα των φυτικών ιστών και φιλτράρουν ορισμένα επιβλαβή ηλιακά μήκη κύματος (π.χ. UV ακτινοβολία) προστατεύοντας έτσι το DNA του φυτού (Shen et al., 2022).

Η λήψη φλαβονολών έχει συσχετιστεί με μία πληθώρα πλεονεκτημάτων για την υγεία που αφορούν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και την ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης αγγειακής νόσου. Συγκεκριμένα, οι διατροφικές φλαβονόλες, εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντιβακτηριακές, αντικρκινικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντικαρκινική δράσης, αποτελεί η κερσετίνη, η οποία σε καρκίνο του ήπατος, αναστέλλει την ηπατοκαρκινογένεση με τη μεσολάβηση Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ), επάγοντας τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα του οργανισμού (Shen et al., 2022).

### 1.2.2.3 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες ή διυδροφλαβόνες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία φλαβονοειδών, είναι πολυφαινολικές ενώσεις με υψηλή και σχεδόν αποκλειστική παρουσία στα εσπεριδοειδή όπως τα πορτοκάλια, τα λεμόνια, το κίτρο αλλά και τα σταφύλια (Chanet et al., 2012). Στις φλαβανόνες, οφείλεται η χαρακτηριστική πικρή γεύση των προϊόντων των εσπεριδοειδών. Ουσίες όπως η εσπεριτίνη (hesperitin), η ναρινγενίνη (naringenin) και η εριοδικτυόλη (eriodictyol), αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της υποομάδας φλαβονοειδών. Οι φλαβανόνες, συνδέονται με μια σειρά από οφέλη για την ανθρώπινη υγεία λόγω των ιδιοτήτων τους, όπως να καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες (Panche et al., 2016). Στις κόκκινες ποικιλίες εσπεριδοειδών, οι φλαβανόνες είναι άφθονες, όπως και οι ανθοκυανίνες. Δομικά, διαθέτουν κορεσμένο τον δακτύλιο (C). Συγκριτικά με τις φλαβόνες, ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 είναι κορεσμένος και αυτή είναι η μόνη δομική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών φλαβονοειδών (Panche et al., 2016). Επιπλέον, διαθέτουν φαινολικό υδρογόνο, λειτουργώντας έτσι ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά μόρια (Shen et al., 2022). Τέλος, επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν την αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψής τους και του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων. Ειδικότερα,

κλινικά και πειραματικά δεδομένα σχετίζονται περαιτέρω με αντιυπερτασικές, αντιλιπιδιακές, αντιδιαβητικές, αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Chanet et al., 2012).

#### 1.2.2.4 Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες, συγκροτούν μία μεγάλη και πολύ χαρακτηριστική υποκατηγορία φλαβονοειδών. Τα ισοφλαβονοειδή καταλαμβάνουν περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο και ανευρίσκονται κυρίως στη σόγια ή τα υποπροϊόντα της, στα όσπρια, στο κόκκινο τριφύλλι και στον ερυθρό οίνο (Ramesh et al., 2021). Μικρές ποσότητες ισοφλαβονών βρίσκονται σε πολλά φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς και δημητριακά (Shen et al., 2022). Επιπλέον, ορισμένα ισοφλαβονοειδή μπορούν να εντοπιστούν και σε μικρόβια. Τα ισοφλαβονοειδή παρουσιάζουν τεράστιες δυνατότητες καταπολέμησης μίας ευρείας κλίμακας ασθενειών. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη (genistein) και η δαϊδζεΐνη (daidzein) θεωρούνται συνήθως φυτοοιστρογόνα λόγω της οιστρογονικής τους δράσης σε ορισμένα ζωικά πρότυπα (Panche et al., 2016). Όσον αφορά τη δομή τους, στα ισοφλαβονοειδή, ο δακτύλιος (B) συνδέεται στη θέση 3 του δακτυλίου (C). Τα ισοφλαβονοειδή μοιάζουν δομικά με την 17-βήτα οιστραδιόλη και συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων, όπου ανάλογα με τα ενδοκρινικά οιστρογονικά επίπεδα, μπορούν να δράσουν είτε ως αγωνιστές είτε ως ανταγωνιστές. Επιπρόσθετα, διαθέτουν σημαντικές δυνατότητες καταπολέμησης διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης, των καρδιαγγειακών παθήσεων, την πρόληψη και τη θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου, τη θεραπεία των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας (Ramesh et al., 2021). Τέλος, οι ισοφλαβόνες διαθέτουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μειώνοντας έτσι, το μακροπρόθεσμο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, αποτρέποντας βλάβες του DNA από τις ελεύθερες ρίζες (Shen et al., 2022).

#### 1.2.2.5 Νεοφλαβόνες

Τα νεοφλαβονοειδή αποτελούν μία κατηγορία πολυφαινολικών φλαβονοειδών ενώσεων. Δομικά στα νεοφλαβονοειδή ο βενζολικός δακτύλιος (B) είναι συνδεδεμένος στη θέση 4 του δακτυλίου (C) (Ramesh et al., 2021). Η πρώτη νεοφλαβόνη που απομονώθηκε από φυσικές πηγές πραγματοποιήθηκε το 1951, και ήταν η καλοφυλλολίδη (calophyllolide), από τους σπόρους *Calophyllum inophyllum* (Panche et al., 2016). Τα νεοφλαβονοειδή εμφανίζουν αρκετές θεραπευτικές ιδιότητες που περιλαμβάνουν αντιαλλεργικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοστεοπορωτικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις (Ramesh et al., 2021).



### 1.2.2.6 Φλαβανόλες ή Κατεχίνες

Οι φλαβανόλες ή διυδροφλαβονόλες ή κατεχίνες, αποτελούν τα 3-υδροξυ παράγωγα των φλαβανονών. Κύριες πηγές φλαβανολών αποτελούν οι μπανάνες, τα μήλα, τα βατόμουρα, τα ροδάκινα και τα αχλάδια. Πρόκειται για μία εξαιρετικά διαφοροποιημένη και πολυυποκατεστημένη υποκατηγορία φλαβονοειδών. Οι φλαβανόλες, βιβλιογραφικά περιγράφονται επίσης ως φλαβαν-3-όλες, καθώς η ομάδα υδροξυλίου είναι συνδεδεμένη στη θέση 3 του δακτυλίου (C). Δομικά, σε σύγκριση με άλλα φλαβονοειδή, στις φλαβανόλες δεν υπάρχει διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 (Panche et al., 2016).

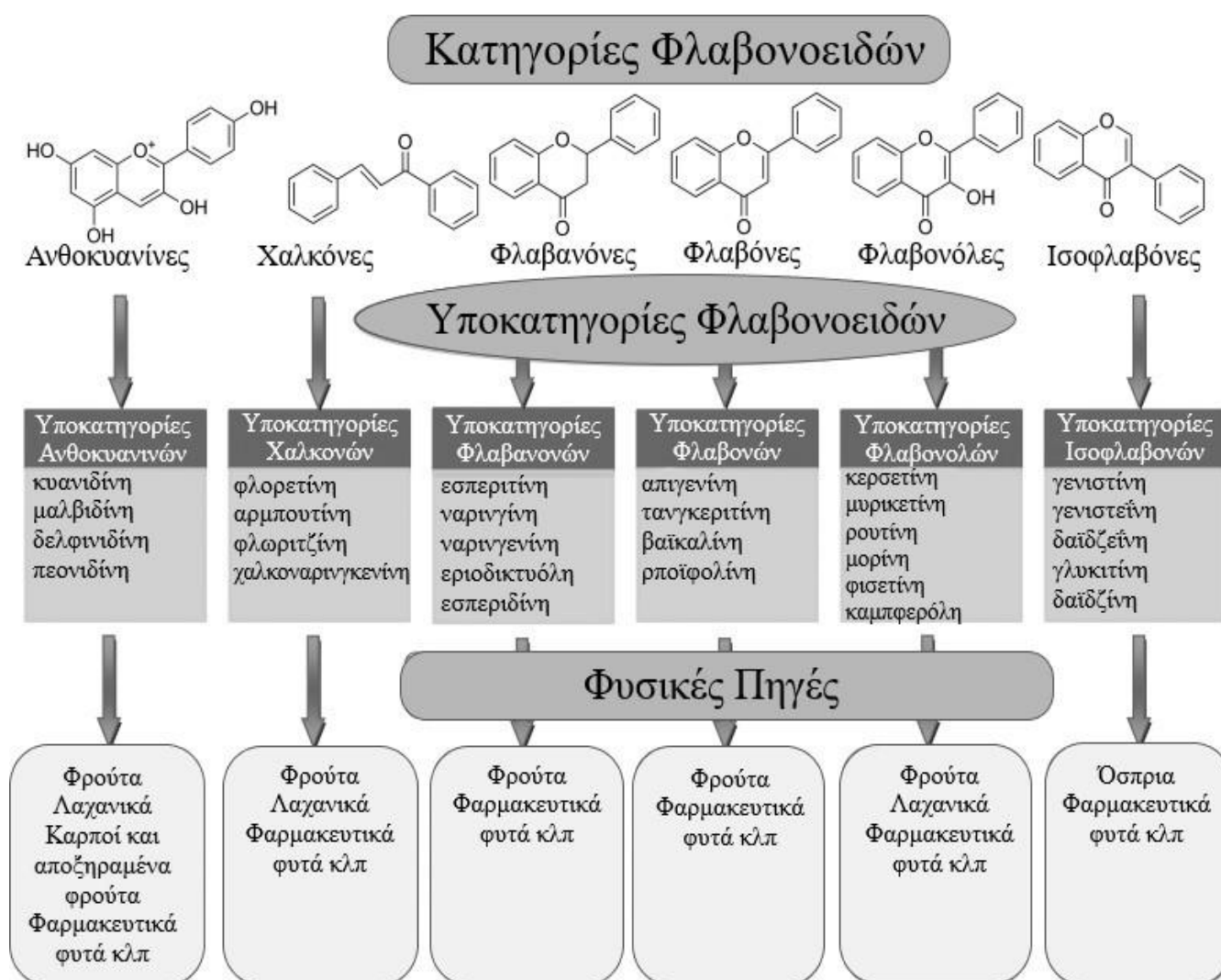
### 1.2.2.7 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν χρωστικές ουσίες, που αποδίδουν τα χαρακτηριστικά χρώματα στα φυτά, τα λουλούδια και τους καρπούς. Εντοπίζονται κυρίως στα εξωτερικά κυτταρικά τοιχώματα πληθώρας φρούτων, όπως τα κράνμπερι, οι μαύρες σταφίδες, τα κόκκινα σταφύλια, τα σμέουρα, τις φράουλες, τα βατόμουρα, και τα μύρτιλλα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ανθοκυανινών είναι η κυανιδίνη (cyanidin), η δελφινιδίνη (delphinidin), η μαλβιδίνη (malvidin), η πελαργονιδίνη (pelargonidin) και η πεονιδίνη (peonidin). Το χρώμα της ανθοκυανίνης εξαρτάται από το pH και από τη μεθυλίωση ή την ακυλίωση των υδροξυλομάδων, στους (A) και (B) δακτυλίους. Η σταθερότητα των ενώσεων αυτών σε συνδυασμό με τις ωφέλιμες ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες για την ευρεία χρήση τους στη βιομηχανία, σε μια πληθώρα εφαρμογών (Panche et al., 2016). Διαφορετικές ανθοκυανίνες εμφανίζουν διαφορετικές δραστηριότητες στην απομάκρυνση των ΔΜΟ. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, εξαρτάται από τον προσανατολισμό του δακτυλίου, τον αριθμό των ελεύθερων υδροξυλίων γύρω από τον πυρονικό δακτύλιο, και τις θέσεις αυτών. Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση τους, οι ανθοκυανίνες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην αποσύνθεση της χοληστερόλης, στην οπτική οξύτητα και στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων στον άνθρωπο (Shen et al., 2022).

### 1.2.2.8 Χαλκόνες

Οι χαλκόνες αποτελούν μία υποκατηγορία φλαβονοειδών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την απουσία του «δακτυλίου C», μίας βασικής δομής του σκελετού των φλαβονοειδών. Ως εκ τούτου, περιγράφονται επίσης και ως φλαβονοειδή ανοιχτής αλυσίδας. Οι χαλκόνες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις ντομάτες, τα αχλάδια, τις φράουλες, τα μούρα και σε συγκεκριμένα σιτηρά. Τα

κυριότερα παραδείγματα χαλκόνων περιλαμβάνουν τη φλωριτζίνη (phloridzin), την αρμπουτίνη (arbutin), τη φλορετίνη (phloretin) και τη χαλκοναρινγκενίνη (chalconaringenin). Τέλος, οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους έχουν συγκεντρώσει μεγάλη ερευνητική προσοχή λόγω των πολυάριθμων βιολογικών και θρεπτικών πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν (Panche et al., 2016).



**Εικόνα 1.6:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι κατηγορίες των φλαβονοειδών, οι υποκατηγορίες τους και οι φυσικές πηγές τους (Panche et al., 2016).

### 1.2.3 Βιολογική Δραστικότητα Φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων, που σχετίζονται με επιδράσεις στην προαγωγή της ανθρώπινης υγείας. Παραδείγματα

ανάλογων θεραπευτικών ιδιοτήτων είναι οι αντιφλεγμονώδεις, οι ηπατοπροστατευτικές, οι αντιμεταλλαξιόνες, οι αντιοξειδωτικές, οι αντινεοπλασματικές, οι αντι-ικές, οι αντιμικροβιακές, οι αντιελμινθικές, οι αντιαλλεργικές, οι αντιορμονικές, αντιαιμοπεταλιακές αλλά και οι αντιθρομβωτικές δράσεις που εμφανίζουν τα флаβονοειδή (Ramesh et al., 2021). Πολυάριθμες *in vitro* μελέτες, αποδεικνύουν την ικανότητα των флаβονοειδών στον έλεγχο των βασικών κυτταρικών ενζύμων. Η ρύθμιση της λειτουργίας των κυτταρικών αυτών ενζύμων, επηρεάζει σημαντικά τις κυτταρικές οδούς που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό, τις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις, καθώς και την απομάκρυνση των τοξινών. Επιπρόσθετα, τα флаβονοειδή δρουν ως χηλικοί παράγοντες των μετάλλων, έχοντας την ικανότητα να δεσμεύσουν τα μεταλλικά ιόντα και να δημιουργούν αδρανή σύμπλοκα, ενώ παράλληλα, μπορούν να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, λειτουργώντας έτσι ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Ramesh et al., 2021).

### 1.2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση

Η κύρια βιολογική δράση των флаβονοειδών, η οποία έχει μελετηθεί εκτενέστερα, είναι η αντιοξειδωτική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση των флаβονοειδών μπορεί να αποτρέψει τη βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες, μέσω της απομάκρυνσης ΔΜΟ, της ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων π.χ. καταλάση (CAT: Catalase), υπεροξειδική δισμουτάση (SOD: Superoxide Dismutase), τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης (GST: Glutathione S-Transferase), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx: Glutathione Peroxidase), της αναστολής της δράσης των οξειδωτικών ενζύμων π.χ. οξειδάση ξανθίνης (XO: Xanthine Oxidase), κυκλοοξυγενάση (COX: Cyclooxygenase), λιποξυγενάση (LOX: Lipoxygenase) και φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάση (PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase), την αύξηση των ριζών α-τοκοφερυλίου και τη μείωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από μονοξείδιο του αζώτου. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των флаβονοειδών μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα του ουρικού οξέος, τη χηλική δραστηριότητα έναντι των μετάλλων και την αντιοξειδωτική δράση χαμηλού μοριακού βάρους, για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (Shen et al., 2022). Τα флаβονοειδή αποτελούν ενεργούς καταστολείς των φλεγμονωδών κυτοκινών, καθώς και ρυθμιστές των οδών που σχετίζονται με τη φλεγμονή, μειώνοντας τη συσσώρευση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των ΔΜΟ. Η αντιοξειδωτική δράση των флаβονοειδών, μπορεί να αυξηθεί *in vitro* μέσω του πολυμερισμού των μονομερών флаβονοειδών, όπως οι προανθοκυανιδίνες, που αποτελούν πολυμερή κατεχινών. Αυτά τα флаβονοειδικά πολυμερή, διαθέτουν εξαιρετικά υψηλή αντιοξειδωτική δράση, λόγω του μεγάλου

αριθμού υδροξυλομάδων που εντοπίζονται στα μόριά τους. Η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών από τα φλαβονοειδή, μπορεί επίσης να αυξηθεί με την ύπαρξη διπλών δεσμών στον φαινολικό δακτύλιο, αλλά και τη γλυκοζυλίωση των ανθοκυανιδινών (Shen et al., 2022). Ορισμένα φλαβονοειδή μπορούν να απομακρύνουν απευθείας τα προϊόντα του οξειδωτικού στρες, ενώ άλλα φλαβονοειδή δρουν έμμεσα ως αντιοξειδωτικά μόρια, καταστέλλοντας τα ένζυμα που δημιουργούν τις ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης ή συνθάση νιτρικού οξειδίου) (Shen et al., 2022). Παράλληλα, ορισμένα φλαβονοειδή όπως οι υδροξυφλαβόνες, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, αποκτώντας έτσι, χηλικές ιδιότητες. Τα συγκεκριμένα φλαβονοειδή, μπορούν να μειώσουν την τοξικότητα των ενεργών μεταλλικών ιόντων, όπως ο δισθενής σίδηρος ή ο δισθενής χαλκός, και να δράσουν ως προοξειδωτικά μόρια. Αυτά τα βλαπτικά μεταλλικά ιόντα, καταλύουν την παραγωγή ΔΜΟ, οδηγώντας σε υπεροξειδωση των λιπιδίων, οξείδωση των πρωτεϊνών και βλάβη του DNA (Shen et al., 2022).

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών, μέσω της αναστολής της δράσης των οξειδασών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή βλαπτικών ανιόντων υπεροξειδίου, φλαβονοειδή όπως η φισετίνη, μπορεί να αναστείλει τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης μειώνοντας έτσι, την οξειδωτική βλάβη. Τέλος, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός μέσω του ουρικού οξέος, δρα με την αύξηση των επιπέδων του στα κύτταρα. Ειδικότερα, το ουρικό οξύ αποτελεί ένα σημαντικό ενδοαγγειακό αντιοξειδωτικό προϊόν, που σχηματίζεται ως το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Δρα φυσιολογικά στα κύτταρα, απομακρύνοντας τα υπεροξυνιτρώδη, ρυθμίζοντας την αντιοξειδωτική δράση και το οξειδωτικό στρες (Shen et al., 2022).

### 1.2.3.2 Αντιφλεγμονώδης Δράση

Η φλεγμονή αποτελεί φυσιολογική βιολογική διεργασία των κυττάρων, ως απόκριση σε ιστικό τραυματισμό, σε μικροβιακή λοίμωξη ή σε κάποιο άλλο χημικό βλαπτικό ερέθισμα. Κατά τη φλεγμονή, ενεργοποιούνται τα φλεγμονώδη κύτταρα του οργανισμού, απελευθερώνονται ΔΜΟ, καθώς και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες με σκοπό την εξουδετέρωση των παθογόνων αλλά και την αποκατάσταση των τραυματισμένων ιστών. Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η διατροφή, οι φαρμακευτικές ουσίες, καθώς και οι φυσικές χημικές ουσίες των τροφίμων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσικών ουσιών των τροφίμων, που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αποτελούν τα μέλη των φλαβονοειδών, τα οποία συμβάλλουν ενεργά στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και των

φλεγμονωδών κυττάρων (Kumar & Pandey, 2013). Ειδικότερα, πολλά φλαβονοειδή εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης, όπως η αναστολή των ρυθμιστικών ενζύμων και των μεταγραφικών παραγόντων, που συμμετέχουν σε μονοπάτια πρόκλησης της φλεγμονής. Τα φλαβονοειδή όπως αναφέρεται και παραπάνω, λειτουργούν επίσης ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες, ικανές να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες αλλά και να μειώνουν το σχηματισμό τους. Επομένως, τα φλαβονοειδή επιδρούν σημαντικά σε πολλά ανοσοκύτταρα αλλά και σε ανοσοποιητικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στις φλεγμονώδεις καταστάσεις (Maleki et al., 2019).

Ένας μηχανισμός αντιφλεγμονώδης δράσης των φλαβονοειδών αποτελεί, η αναστολή των ενζυμικών πρωτεϊνικών κινασών και των μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, οι πρωτεϊνικές κινάσες δρουν, στη μεταγωγή του σήματος κατά την κυτταρική ενεργοποίηση σε καταστάσεις φλεγμονής, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Διάφορα φλαβονοειδή, έχει βρεθεί πως αναστέλλουν ανάλογες κινάσες, όπως η κινάση της φωσφοϊνοσιτόλης, η κινάση πρωτεΐνης C, η κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης, η κινάση τυροσίνης (Maleki et al., 2019). Η αναστολή των κινασών οφείλεται στην ανταγωνιστική σύνδεση των φλαβονοειδών με το ATP, σε καταλυτικές θέσεις στα ένζυμα (Kumar & Pandey, 2013).

Δεύτερος αντιφλεγμονώδης μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών, πραγματοποιείται μέσω της αναστολής της φωσφοδιεστεράσης. Τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν φωσφοδιεστεράσες όπως η κυκλική φωσφοδιεστεράση cAMP (Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη ή Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)). Το κυκλικό cAMP, αποτελεί απαραίτητο μόριο αγγελιοφόρου-κλειδί, στη ρύθμιση διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών κατά τη διαδικασία της φλεγμονής, με τα υψηλά επίπεδα cAMP, να συσχετίζονται με αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Οι φωσφοδιεστεράσες, διαθέτουν την ικανότητα να υδρολύουν το cAMP, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του, άρα και την αντιφλεγμονώδη δράση του. Επομένως, οι ανασταλτικές δράσεις των φλαβονοειδών στις φωσφοδιεστεράσες, έχουν τη δυνατότητα να αποτρέπουν την αποικοδόμηση του cAMP, και να δημιουργούν αντιφλεγμονώδεις συνθήκες για το κύτταρο (Maleki et al., 2019).

Τέλος, ακόμη ένας αντιφλεγμονώδης μηχανισμός δράσης των φλαβονοειδών, αποτελεί η επίδρασή τους, στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Ειδικότερα, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται κατά τη φλεγμονή, από τα δομικά φωσφολιπίδια των πλασματικών κυτταρικών μεμβρανών, με τη δράση του ενζύμου που καταλύει την αντίδραση, τη φωσφολιπάση A2, (PLA2: Phospholipase A2). Το αραχιδονικό οξύ στη συνέχεια μεταβολίζεται από διαφορετικά ένζυμα, τις οξυγενάσες, όπως η κυκλοοξυγενάση (COX: Cyclooxygenase) και η λιποξυγενάση (LOX: Lipoxygenase), προκειμένου να παραχθούν προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες, λευκοτριένια και άλλα

φλεγμονώδη διαμεσολαβητικά μόρια. Τα φλαβονοειδή έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, μειώνοντας την απελευθέρωση των φλεγμονωδών μορίων που προέρχονται από αυτό το μονοπάτι. Παραδείγματος χάρη, τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, των θρομβοξανών, και των λευκοτριενίων μέσω της αναστολής του ενζύμου, φωσφολιπάση A2, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή των φλεγμονωδών αυτών βιομορίων (Maleki et al., 2019).

### 1.2.3.3 Αντιμικροβιακή Δράση

Τα φλαβονοειδή, είναι γνωστό πως συντίθενται από τα φυτικά κύτταρα, ως απόκριση σε μικροβιακή μόλυνση του φυτού. Επομένως, διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, έναντι μιας ευρείας σειράς μικροοργανισμών (Kumar & Pandey, 2013). Αρκετά φλαβονοειδή, όλων των υποκατηγοριών, έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ισχυρή αντιβακτηριακή, αντι-ιική, αντιμυκητιακή, αντιπαρασιτική, και αντιελμινθική δράση, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω (Biharee et al., 2020).

#### **Αντιβακτηριακή Δράση**

Πολλά φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, έναντι φυτικών μικροβιακών παθογόνων, αλλά παράλληλα, μπορούν να είναι αποτελεσματικά και στην καταπολέμηση των ανθρώπινων παθογόνων. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή φυτικής προέλευσης, διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς αντιβακτηριακής δράσης, συγκριτικά με αυτούς των συμβατικών αντιβακτηριακών φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη. Επομένως, τα βακτήρια ή άλλα μικροβιακά παθογόνα, δεν μπορούν αναπτύξουν αντιμικροβιακή αντοχή, έναντι των φυτικών αντιμικροβιακών ενώσεων, καθώς δεν κωδικοποιούνται από τα ίδια γονίδια μικροβιακής αντοχής των συμβατικών φαρμάκων, αποτελώντας έτσι κατάλληλους φορείς αντιβακτηριακής θεραπείας (Biharee et al., 2020). Τα αντιβακτηριακά φλαβονοειδή, μπορούν να στοχεύουν σε πολλαπλούς κυτταρικούς στόχους, αντί για ένα μεμονωμένο. Βασικοί μηχανισμοί δράσης, των αντιβακτηριακών φλαβονοειδών, αποτελούν μηχανισμοί οι οποίοι αναστέλλουν: τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (κερσετίνη, καεμπφερόλη, φισετίνη), τη σύνθεση των βακτηριακών νουκλεϊκών οξέων, μέσω της αναστολής των βακτηριακών τοποϊσομερασών (DNA γυράση) όπως (γενιστεΐνη, κερσετίνη, απιγενίνη), τη βακτηριακή κινητικότητα (κερσετίνη, ναριγγενίνη, μορίνη), τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και της σύνθεσης ATP (ισοβαβαχαλκόνη, λικοχαλκόνη, βαϊκελαΐνη), την παραγωγή των βακτηριακών τοξινών (απιγενίνη, φισετίνη, μορίνη), τη σύνθεση και την ωρίμανση του βιοφίλμ (φλορετίνη, κατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη), τη βακτηριακή λοιμογόνο δράση εξαρτώμενη από ένζυμα (πχ ουρεάση, το

ένζυμο που επιτρέπει στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, να επιβιώνει στο χαμηλό pH του στομάχου) όπως η (βαϊκαλίνη, σκουτελαρίνη, ναριγγενίνη), την ακεραιότητα της βακτηριακής πλασματικής μεμβράνης (πχ μείωση της ρευστότητας ή της διαπερατότητάς της, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο) όπως (κατεχίνη, απιγενίνη, μορίνη) και τη λειτουργία των βακτηριακών αντλιών εκροής (συλιβινίνη, κερσετίνη, μορίνη) (Biharee et al., 2020).

### **Αντιμυκητιακή Δράση**

Στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των флаβονοειδών, περιλαμβάνεται και η ανασταλτική δράση τους, έναντι της εκβλάστησης των σπορίων των μυκήτων και άλλων φυτικών παθογόνων. Επομένως, τα флаβονοειδή αποτελούν ιδανικό πεδίο έρευνας, για την ανάπτυξη νέων αντιμυκητιακών φαρμάκων, για ανθρώπινη χρήση. Σε πληθώρα ερευνών, τα флаβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι επιδεικνύουν αξιοσημείωτα συνεργιστικά αντιμυκητιακά αποτελέσματα, έναντι των μυκητιακών παθογόνων. Φλαβονοειδή όπως, οι флаβόνες, οι флаβονόλες και οι флаβανόνες, εμφανίζουν ισχυρές αντιμυκητιακές δράσεις, δρώντας συνεργιστικά με συμβατικά αντιμυκητιακά φάρμακα όπως οι αζόλες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί, η βαϊκαλίνη, ανεξάρτητα εάν χρησιμοποιείται μόνη της ή συνεργιστικά, εμφάνισε ισχυρές αντιμυκητιακές δράσεις έναντι αρκετών μυκητιακών στελεχών (Jin, 2019).

Οι αντιμυκητιακές ιδιότητες των флаβονοειδών, οφείλονται σε μηχανισμούς διάσπασης ή αναστολής της σύνθεσης του βιοφίλμ, αλλά και σε άλλους κυτταρικούς ανασταλτικούς μηχανισμούς, με τις флаβονόλες και τις χαλκόνες να διαθέτουν την πιο ισχυρή *in vivo* αντιμυκητιακή δράση. Ειδικότερα, σε ένα μοντέλο αιδοιοκολπικής καντιντίασης μύος, από *Candida albicans*, η κερσετίνη (φλαβονόλη) εμφάνισε σημαντική αποτελεσματικότητα, στην καταπολέμηση των μυκήτων. Επιπρόσθετα, σε στοματική καντιντίαση μύων, από *Candida albicans*, η λιχοχαλκόνη-A (χαλκόνη) προκάλεσε μείωση του μυκητιακού πληθυσμού (Nguyen et al., 2021). Επομένως, η αποκλειστική ή συνδυαστική χρήση αντιμυκητιακών флаβονοειδών, μπορεί να αποβεί χρήσιμη στη θεραπεία λοιμώξεων των στοματικών κοιλοτήτων, του εντέρου και του κόλπου, από *Candida albicans*, που προκύπτουν από υπερβολική κατανάλωση αντιβιοτικών (Friedman, 2007).

### **Αντι-ική Δράση**

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για την αντιική δράση των флаβονοειδών, έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία, λόγω της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης των ιογενών λοιμώξεων, όπως η γρίπη, με εκατομμύρια ασθενείς να νοσούν ετησίως. Τα συνθετικά αντι-ικά φάρμακα συχνά παρουσιάζουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ τα φυτικά флаβονοειδή, εμφανίζουν σημαντικές αντι-ικές ιδιότητες, χωρίς ή ήπιες παρενέργειες, αποτελώντας έτσι ιδανική εναλλακτική λύση για τη θεραπεία διαφόρων ιογενών λοιμώξεων (Ninfali et al., 2020). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους τα αντι-ικά флаβονοειδή

αναστέλλουν τη δράση των ιών. Αρχικά, μπορούν να εμποδίζουν την προσκόλληση και την είσοδο των ιών στα κύτταρα-ξενιστές, να αναστέλλουν τις διάφορες φάσεις της αντιγραφής και της μεταγραφής του ιικού DNA, να παρεμποδίζουν τη μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών καθώς τη μετα-μεταφραστική επεξεργασία αυτών. Επιπλέον, μπορούν να περιορίζουν την εξάπλωση του ιού στα υγιή κύτταρα, αφού προσκολλώνται στις επιφανειακές ιικές πρωτεΐνες, εμποδίζοντας τον ιό να εισέλθει στα υγιή κύτταρα-ξενιστές. Παρόλα αυτά, τα ερευνητικά αυτά δεδομένα βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ιών και φλαβονοειδών, που εμφανίζουν ισχυρή δράση έναντι των ιών, παρουσιάζονται παρακάτω στον (Πίνακα 1.1) (Badshah et al., 2021).

### **Αντιπαρασιτική Δράση**

Τα φλαβονοειδή, όπως αναφέρεται και παραπάνω, διαθέτουν σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες, που επεκτείνονται και στους παρασιτικούς μικροοργανισμούς. Ειδικότερα, αντιπαρασιτικά φλαβονοειδή, φαίνεται να δρουν έναντι παρασιταμιών όπως η ελονοσία. Η ελονοσία, προκαλείται από πρωτόζωα, και συγκεκριμένα το πλασμώδιο της ελονοσίας, μικροοργανισμός ο οποίος παρασιτεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπινου οργανισμού. Το πλασμώδιο *Plasmodium falciparum* και άλλα είδη, αποτελούν στόχους των ανθελονοσιακών φαρμάκων, με τα φυτικά εκχυλίσματα των φλαβονοειδών (επικατεχίνη, καμπφερόλη, κερσετίνη, σιλυμαρίνη) να εμφανίζουν αντιπλασμοδιακές ιδιότητες (Ullah et al., 2020). Επιπλέον, φλαβονοειδή της υποκατηγορίας των χαλκονών, σε μορφή υβριδίων με άλλα ανθελονοσιακά φάρμακα, μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμη θεραπευτική παρέμβαση στο πλαίσιο του περιορισμού της ελονοσίας. Μεγάλος αριθμός υβριδίων χαλκονών, έχουν μελετηθεί για την *in vitro* αντιπλασμοδιακή αλλά και την *in vivo* ανθελονοσιακή δράση τους, εμφανίζοντας σημαντικά αποτελέσματα (Cheng et al., 2020). Μεταξύ των πρωτοζώων, έναντι των οποίων φαίνεται να δρουν τα φλαβονοειδή, περιλαμβάνεται και η ιστολυτική αμοιβάδα *Entamoeba histolytica*, παράσιτο το οποίο προσβάλλει το γαστρεντερικό σύστημα, προκαλώντας αμοιβαδική δυσεντερία. Φλαβονοειδή όπως η καμπφερόλη, η επικατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη, εμφανίζουν σημαντική ανασταλτική δράση κατά των τροφοζωιτών της *Entamoeba histolytica*, προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές στα δομικά στοιχεία των αμοιβάδων, όπως συμπύκνωση της χρωματίνης και αναδιοργάνωση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών τους (Martínet-Castillo et al., 2018).

Άλλες παρασιτικές λοιμώξεις με αποδεδειγμένη αντιπαρασιτική δράση των φλαβονοειδών αποτελούν, η λεισμανίαση έναντι του παρασίτου *Leishmania donovani*, με την καμπφερόλη να προκαλεί θανάτωση των παρασίτων, και την τοξοπλάσμωση έναντι του παρασίτου *Toxoplasma gondii*, με την κερσετίνη να αναστέλλει τη σύνθεση των HSP90, HSP70 και HSP27, πρωτεΐνες που αποτελούν παράγοντες της λοιμογόνου δράσης του παρασίτου (Cheng et al., 2020).



**Πίνακας 1.1:** Στον πίνακα παρουσιάζονται τα φλαβονοειδή έναντι των ιών στους οποίους δρουν (Badshah et al., 2021).

ΙΟΣ	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΕΣ ΕΝΑΝΤΙ ΙΟΥ
Ιοί Ηπατίτιδας A, B, C	Απιγενίνη, Κερσετίνη, Επιγαλλοκατεχίνη
Ιός της Γρίπης	Βιτεξίνη, Βαϊκαλίνη, Καμφερόλη, Κερσετίνη
Ιός του Δάγκειου Πυρετού	Επιγαλλοκατεχίνη, Βαϊκαλίνη, Φισετίνη
Ιός Ζίκα	Επιγαλλοκατεχίνη, Ισοκερσετίνη, Μυρικετίνη, Ναρινγενίνη
Αναπνευστικός Συγκυτιακός Ιός	Βιτεξίνη, Λουτεολίνη, Τανγκερετίνη, Νομπιλετίνη
Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας	Βαϊκαλίνη, Γενιστεΐνη, Κερσετίνη, Καμφερόλη
Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός	Βαϊκαλίνη, Γενιστεΐνη
Ιός Απλού Έρπητα	Γκαλαγγίνη, Επικατεχίνη, Επιγαλλοκατεχίνη, Κερσετίνη
Κορωνοϊοί	Καμφερόλη, Πεκτολιναρίνη, Ερβακετίνη, Ροϊφολίνη

#### 1.2.3.4 Αντικαρκινική Δράση

Η διατροφή είναι γνωστό πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και την εμφάνιση του καρκίνου. Τα φρούτα και τα λαχανικά που περιέχουν φλαβονοειδή, αποτελούν παράγοντες χημειοπροφύλαξης έναντι των κακοηθειών. Παράδειγμα, η κατανάλωση τροφών πλούσιες σε κερσετίνη, σχετίζεται αντιστρόφως με τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, του πνεύμονα, του στομάχου και του μαστού. Επιπλέον, η κατανάλωση κρασιού φαίνεται να σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, του ενδομητρίου, του οισοφάγου, του στομάχου καθώς και του παχέος εντέρου. Επομένως, η σημαντική αυτή σχέση πρόσληψης φρούτων και λαχανικών με την πρόληψη των κακοηθειών, κατέχει σημαντικά οφέλη για τη δημόσια υγεία (Kumar & Pandey, 2013).

Έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών κατά τα στάδια της έναρξης και εξέλιξης της καρκινογένεσης. Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών στοχεύουν στα εξής: στη μείωση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53, στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων, στην αναστολή της κινάσης τυροσίνης, στην αναστολή των HSPs, στην ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα οιστρογόνων και στην αναστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών Ras. Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53, αποτελούν τις πιο κοινές γενετικές ανωμαλίες στους ανθρώπινους καρκίνους. Η αναστολή της έκφρασης του γονιδίου p53, μπορεί να προκαλέσει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στη φάση G2-M, των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί πως μειώνουν την έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53, σε σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Οι κινάσες τυροσίνης αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, με την έκφρασή τους να εμπλέκεται στην

ογκογένεση, μέσω της ικανότητας τους να παρακάμπτουν το φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Έτσι, φάρμακα που αναστέλλουν τις κινάσες τυροσίνης, αποτελούν πιθανούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Η κερσετίνη αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα флаβονοειδούς, η οποία αναστέλλει τις τυροσινικές κινάσες (Kumar & Pandey, 2013).

Οι HSPs σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53, το οποίο επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να παρακάμπτουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς τερματισμού του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, επιτρέπουν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, υπό συνθήκες κυτταρικού στρες. Τα флаβονοειδή έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την παραγωγή των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, σε αρκετές κακοήθεις κυτταρικές σειρές, όπως ο καρκίνος του μαστού, η λευχαιμία και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Kumar & Pandey, 2013). Τέλος, παραδείγματα флаβονοειδών με αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση είναι η κερσετίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η γενιστεΐνη, η εσπεριδίνη, η μυρικετίνη και η ρομπινετίνη (Kumar & Pandey, 2013).

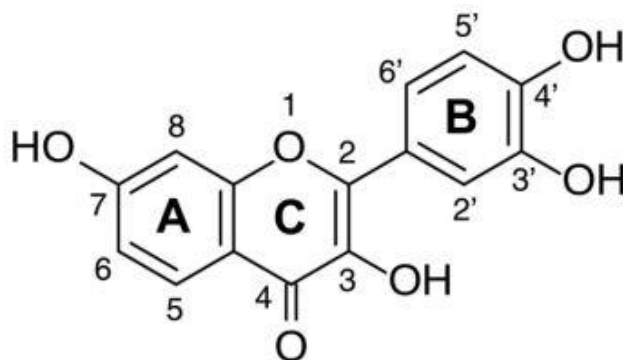
### 1.3 HSP70 και Φλαβονοειδή

Οι περισσότερες έρευνες των флаβονοειδών έναντι της HSP70, έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην αντικαρκινική δράση που διαθέτουν τα флаβονοειδή, μέσω της αναστολής των HSPs. Οι φυσικές αυτές ενώσεις, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου, μέσω της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της HSP70 (Moradi-Marjaneh et al., 2019). Διάφορα флаβονοειδή έχει αποδειχθεί πως διαθέτουν ανασταλτική δράση έναντι της HSP70, όπου χαρακτηριστικά παραδείγματα αναφέρονται παρακάτω. Ένα φυσικό πολυφαινολικό флаβονοειδές, η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη-3 (EGCG: Epigallocatechin-3-Gallate), έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προκαλεί κυτταροτοξικότητα, σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πρωτεΐνη - στόχος της EGCG, αποτελεί η ρυθμιζόμενη από γλυκόζη πρωτεΐνη - μοριακός συνοδός GRP78 (Glucose Regulated Protein 78 ή GRP78), μέλος της οικογένειας των HSP70, η οποία εκφράζεται ανώμαλα στην κυτταρική επιφάνεια πολλών καρκινικών κυττάρων και αποτελεί επίσης δυσμενή προγνωστικό δείκτη, ως αυτοαντιγόνο σε πολλούς καρκίνους (Ray, 2018). Η EGCG αναστέλλει τη δραστηριότητα της GRP78 *in vitro*, και κατ' επέκταση τη ρύθμιση της HSP70 (Moradi-Marjaneh et al., 2019). Επομένως, η αντικαρκινική δράση της EGCG βασίζεται στην αναστολή της HSP70 και μπορεί να αποτελέσει ισχυρό αντικαρκινικό παράγοντα για μελλοντική έρευνα (Tran et al., 2010). Η κερσετίνη, ένα άλλο флаβονοειδές, μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση και την έκφραση του HSP70 σε πληθώρα καρκινικών κυτταρικών σειρών, έχοντας αντικαρκινική και αντινεοπλασματική δράση (Moradi-Marjaneh et al., 2019). Σε έρευνα, όπου μελετήθηκε ο ρόλος της κερσετίνης, ως αναστολέας των HSPs, σε ανθρώπινα αποπτωτικά

καρκινικά κύτταρα του μαστού, βρέθηκε πως η κερσετίνη μειώνει τα επίπεδα της HSP70 κατά 65% (Kiyga et al., 2020). Η εσπεριτίνη, ένα флаβονοειδές που βρίσκεται στα εσπεριδοειδή, διαθέτει αντικαρκινική δράση, μέσω της μείωσης της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, της πρόκλησης της απόπτωσης αλλά και της μείωσης των επιπέδων της HSP70, ενός αρνητικού ρυθμιστή της οδού της μιτοχονδριακής απόπτωσης, που συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορα καρκινικά κύτταρα και ενοχοποιείται για την ανάπτυξη των όγκων. Έτσι, η εσπεριτίνη, διαθέτει την ικανότητα μείωσης των επιπέδων της HSP70, παράλληλα ενισχύοντας τον μιτοχονδριακό αποπτωτικό καταρράκτη (Tanaka et al., 2022). Τέλος, η καμπφερόλη, αποτελεί флаβονοειδές με αντικαρκινική και ηπατοπροστατευτική δράση, αναστέλλοντας την έκφραση της HSP70, τόσο της κυτοσολιακής όσο και της μιτοχονδριακής, σε ηπατοκύτταρα. Επομένως, η καμπφερόλη περιορίζει τα βλαπτικά ερεθίσματα, όπως η τοξικότητα στα ηπατοκύτταρα, μέσω της συνεχούς αναστολής της HSP70 (Zhou et al., 2018).


















### 1.3.1 HSP70 και Φισετίνη

Η φισετίνη ή αλλιώς 3,7,3',4'-τετραϋδροξυφλαβόνη ή 3-υδροξυφλαβόνη ή 5-δεοξυκερσετίνη, αποτελεί μία πανταχού παρούσα βιοδραστική φυτική флаβονόλη, μέλος των πολυφαινολικών флаβονοειδών, που συντίθεται από τον δευτερογενή μεταβολισμό στα φυτά (Sundarraaj et al., 2018). Δομικά, η φισετίνη διαθέτει τη μορφή διφαινυλοπροπανίου, που περιέχει δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μέσω ενός οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου με τρεις άνθρακες, και συμπληρώνεται με τέσσερις υποκαταστάσεις υδροξυλομάδων και μία καρβονυλομάδα (Εικόνα 1.7) (Kashyar et al., 2018). Η βιολογική δραστηριότητα της φισετίνης οφείλεται στην παρουσία υδροξυλομάδων στις θέσεις (C-3, C-3', C-4', C-7) των τριών δακτυλίων, και της καρβονυλομάδας στη θέση (C-4) του ετεροκυκλικού δακτυλίου (Kashyar et al., 2019). Οι υδροξυλομάδες της φισετίνης, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας έτσι από τις ΔΜΟ, αλλά και να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Sundarraaj et al., 2018).



**Εικόνα 1.7:** Στην εικόνα απεικονίζεται η χημική δομή της φισετίνης ( $C_{15}H_{10}O_6$ ). Η φισετίνη ονομάζεται επίσης 3-υδροξυφλαβόνη ή 5-δεοξυκερσετίνη (Sundarraaj et al., 2018).

Η φισετίνη, βρίσκεται σε διάφορα φρούτα και λαχανικά όπως είναι τα μήλα, τα σταφύλια, οι λωτοί, οι φράουλες, τα αγγούρια, τα κρεμμύδια, αλλά και στο τσάι, και χρησιμεύει ως χρωστικός παράγοντας στα φυτά. Τα επίπεδα της, κυμαίνονται σε συγκεντρώσεις από 0,1 μg/g έως 539 μg/g, σε διαφορετικά φρούτα και λαχανικά, και η μέση ημερήσια πρόσληψη φισετίνης εκτιμάται ότι είναι περίπου 0,4 mg στον άνθρωπο. Τα υψηλότερα επίπεδα φισετίνης σε τροφή, εντοπίζονται στις φράουλες, με συγκέντρωση φισετίνης 160 μg/g (Εικόνα 1.8) (Sundarraaj et al., 2018). Έχει βρεθεί πως η φισετίνη παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών βιολογικών λειτουργιών στον άνθρωπο, εμφανίζοντας αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαγγειογενετική, αντιλιπιδαιμική, νευροπροστατευτική και αντικαρκινική δράση (Kashyar et al., 2018). Όσον αφορά την αντικαρκινική της δράση, η φισετίνη στοχεύει σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του προστάτη, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, η οξεία μυελογενής λευχαιμία, το μελάνωμα, ο καρκίνος του στομάχου, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του στόματος, ο καρκίνος του νεφρού και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, επάγοντας λειτουργίες που οδηγούν στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο, καθώς και στον περιορισμό της αγγειογένεσης και της μετάστασης (Sundarraaj et al., 2018). Παρόλα αυτά, αν και η φισετίνη είναι μία ισχυρή βιοδραστική ένωση με πληθώρα ευεργετικών λειτουργιών για τον ανθρώπινο οργανισμό, διαθέτει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και πτωχή απορρόφηση από το έντερο, επομένως και μικρή βιοδιαθεσιμότητα, δυσχεραίνοντας τη χρήση της προς όφελος του ανθρώπου (Kashyar et al., 2018).

<b>ΦΥΤΑ</b>								
	Χαμομήλι 28 µg/g	Ανθός Μοσχολέμονου 39 µg/g						
<b>ΦΡΟΥΤΑ</b>								
	Μήλο 26.9 µg/g	Ακτινίδιο 2 µg/g	Λωτός 10.6 µg/g	Ροδάκινο 0.6 µg/g	Κόκκινα Σταφύλια 0.255 µg/g	Φράουλες 160 µg/g	Λευκά Σταφύλια 0.176 µg/g	
	<b>ΛΑΧΑΝΙΚΑ</b>							
		Αγγούρι 0.1 µg/g	Ρίζα Λωτού 5.8 µg/g	Κρεμμύδι 4.8 µg/g	Ντομάτα 0.1 µg/g			
		<b>ΤΣΑΙ</b>						
			Μαύρο 109 µg/g	Κεϋλάνης 174 µg/g	Πράσινο 539 µg/g	Κόκκινο 320 µg/g		

**Εικόνα 1.8:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις της φισετίνης σε (µg/g), σε άνθη, φρούτα, λαχανικά και τσάι (Sundarraaj et al., 2018).

Όσον αφορά τη φισετίνη και την HSP70, έχει αποδειχθεί πως η φισετίνη δρα ανταγωνιστικά έναντι της HSP70. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η έκφρασης της HSP70, εξαρτάται από την ενεργοποίηση ενός μεταγραφικού παράγοντα, και συγκεκριμένα του μεταγραφικού παράγοντα θερμικού σοκ 1 (HSF1: Heat Shock Transcription Factor 1). Σε διάφορες συνθήκες κυτταρικού στρες όπως η αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και σε καρκινικά κύτταρα, προκαλείται η ενεργοποίηση του HSF1, ο οποίος προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου της HSP70, επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου και κατ' επέκταση την παραγωγή της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (Xing et al., 2004). Ο HSF1 σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ έπειτα από στρεσογόνα ερεθίσματα, μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και συνδέεται με τους υποκινητές της HSP70.

Ο HSF1 ενεργοποιείται σε διάφορες μορφές καρκίνου, αποτελεί παράγοντας ζωτικής σημασίας για την ενίσχυση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, τα οποία υπόκεινται καταστάσεις κυτταρικού στρες, και αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης του καρκίνου, όπως στον καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα. Η φισετίνη έχει την ικανότητα να αναστέλλει την επαγόμενη από θερμικό σοκ, πρόσδεση του HSF1 στον υποκινητή του γονιδίου της HSP70, δίχως όμως να εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα HSF1. Επομένως, ο

μηχανισμός δράσης της φισετίνης δεν σχετίζεται με το στάδιο της μετατόπισης του HSF1 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, αλλά με την αναστολή της δράσης του HSF1, κατά το στάδιο της δέσμευσης του, στους υποκινητές της HSP70, εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου και ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση της πρωτεΐνης (Kim et al., 2015). Επομένως, η φισετίνη διαθέτει σημαντική αντικαρκινική δράση, λειτουργώντας ως ένας ισχυρός αναστολέας του HSF1, αλλά και παρεμβαίνοντας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας απόπτωση. Έτσι, τα χαμηλά επίπεδα της HSP70, αποσταθεροποιήσουν τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 αλλά και μειώνουν την έκφρασή τους, προκαλώντας τον θάνατο των αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, ο HSF1 σε συνδυασμό με τη φισετίνη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο, ως χημειοπροφυλακτικό παράγοντα ασθενών με καρκίνο (Kim et al., 2015).

Ωστόσο είναι σημαντικό να επισημανθεί, πως η φισετίνη απορροφάται ελάχιστα, με την *per os* χορήγηση, περιορίζοντας την αύξηση των θεραπευτικών συγκεντρώσεων της στο πλάσμα, με αποτελέσματα η κλινική της χρησιμότητα έναντι του καρκίνου, να είναι περιορισμένη. Επομένως, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της φισετίνης καθώς και οι περιορισμένες, έως τώρα, γνώσεις σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα των διαφόρων μεταβολιτών της, εξακολουθούν να περιορίζουν την πιθανή κλινική εφαρμογή αυτού του πολλά υποσχόμενου φυσικού φλαβονοειδούς, και υποδηλώνουν την ανάγκη για περαιτέρω διεξαγωγή *in vitro* και *in vivo* μελετών. Τέλος, η σύνθεση παραγώγων φισετίνης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για τη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής δράσης της, αλλά και για την επίλυση των προβλημάτων της βιοδιαθεσιμότητας και της υδατοδιαλυτότητας (Kashyap et al., 2018).

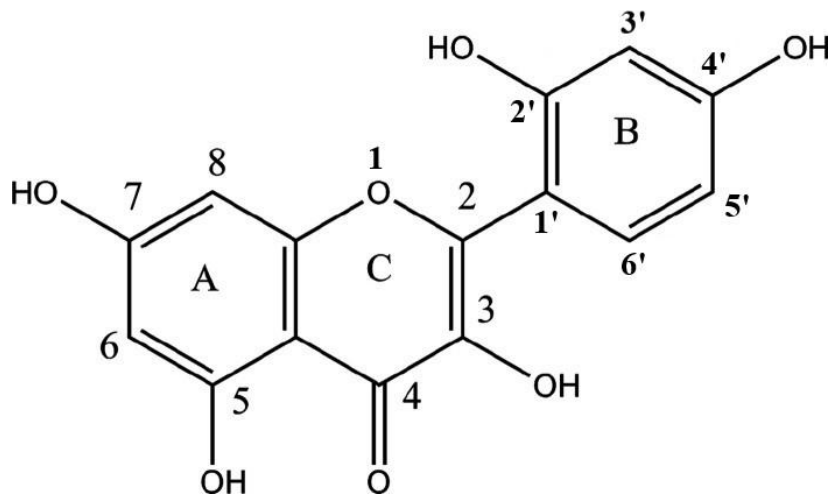
### 1.3.2 HSP70 και Μορίνη

Η μορίνη ή αλλιώς 3,5,7,2',4'-πενταϋδροξυφλαβόνη, αποτελεί μια φλαβονόλη που απομονώνεται ως κίτρινη χρωστική ουσία από διάφορα φυτά, ιδιαίτερα της οικογένειας των Μορεοειδών (Moraceae), των Φηγοειδών (Fagaceae) και των Ροδοειδών (Rosaceae). Δομικά η μορίνη, όπως και όλα τα φλαβονοειδή, διαθέτει τη βασική σκελετική δομή (C6-C3-C6), που περιέχει δύο αρωματικούς βενζολικούς δακτυλίους, τον (A) και τον (B), οι οποίοι συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρενίου (C) που περιέχει οξυγόνο (Εικόνα 1.9). Οι χημικές ιδιότητες της μορίνης, οφείλονται στην παρουσία πέντε πολικών υδροξυλομάδων, οι οποίες είναι προσαρτημένες στις θέσεις (C-2', C-4', C-3, C-5 και C-7) των τριών δακτυλίων. Η μορίνη αποτελεί ισομερής ένωση της κερσετίνης, αφού οι δύο αυτές ουσίες, διαθέτουν σχεδόν τις ίδιες

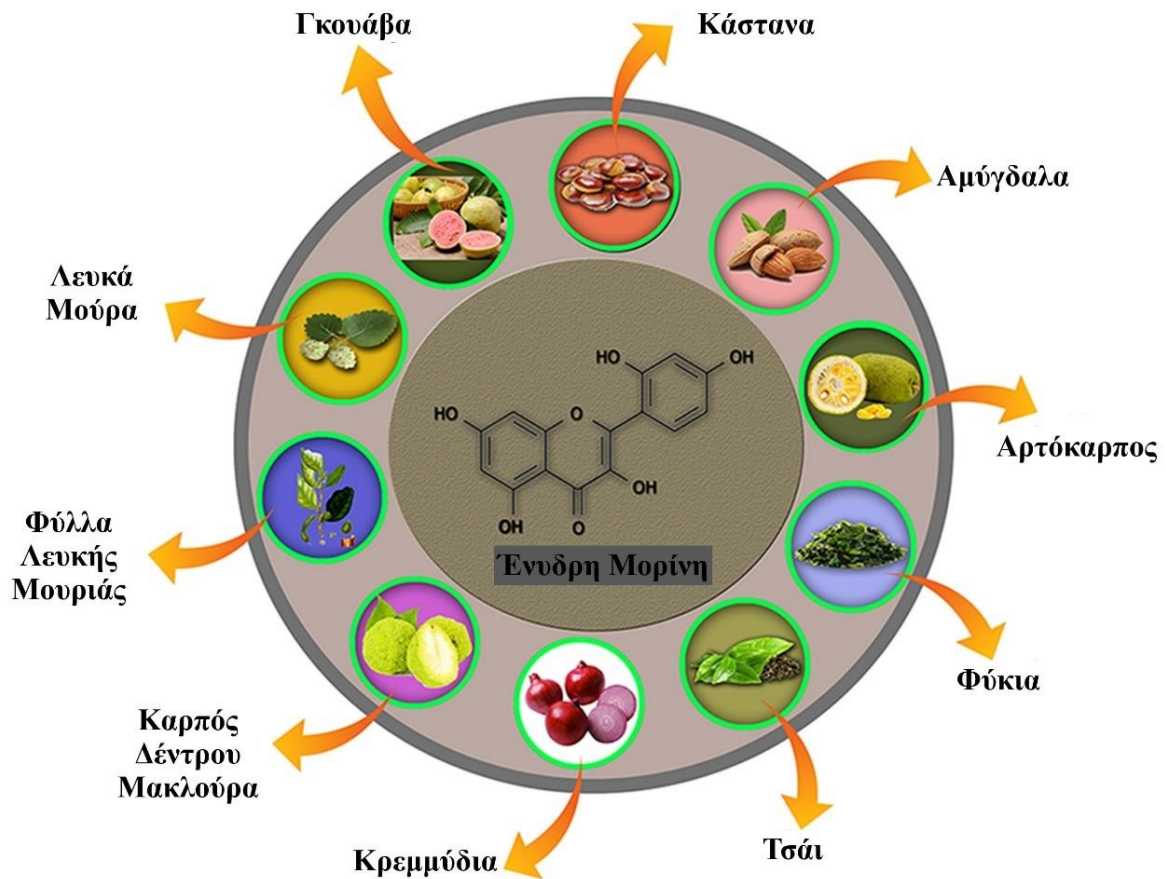
υποκαταστάσεις υδροξυλομάδων στον σκελετό τους, με τη διαφορά πως η μορίνη, στον (B) δακτύλιο της, διαθέτει υποκαταστάσεις υδροξυλομάδων στις θέσεις (C-2') και (C-4'), ενώ αντίθετα η κερσετίνη, στον (B) δακτύλιο της, διαθέτει υδροξυλομάδες στις θέσεις (C-3') και (C-4').

Σε καθαρή μορφή η μορίνη, είναι πικρή, σταθερή ένωση με έντονο κίτρινο χρώμα και αδιάλυτη στο νερό, ενώ σε αλκαλικό υδατικό διάλυμα, το έντονο κίτρινο χρώμα της, μετατρέπεται σε καφέ χρώμα, όταν αυτή εκτεθεί στον αέρα (Rajput et al., 2021). Στο εμπόριο, η μορίνη διατίθεται ως «Ένυδρη Μορίνη» (Solairaja et al., 2021). Στη βιομηχανία, χρησιμοποιείται ως η καλύτερη κίτρινη βαφή για βαμβάκι, μαλλί και μετάξι (Rajput et al., 2021) αλλά και επίσης ως συντηρητικό τροφίμων (Ghosh et al., 2022).

Η μορίνη, βρίσκεται σε διάφορα φρούτα, λαχανικά και φυτά όπως τα κλαδιά της λευκής μουριάς, τη γκουάβα αλλά και τα φύλλα της, τον καρπό του δέντρου Μακλούρα, τα μήλα, τα κρεμμύδια, τα αμύγδαλα, τα σύκα, το κάστανο, τον αρτόκαρπο (jackfruit), το κόκκινο κρασί, τα φύκια, το τσάι, τον καφέ και τα δημητριακά (Εικόνα 1.10) (Rajput et al., 2021).



**Εικόνα 1.9:** Στην εικόνα απεικονίζεται η μοριακή δομή της μορίνης ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) (Ghosh et al., 2022).

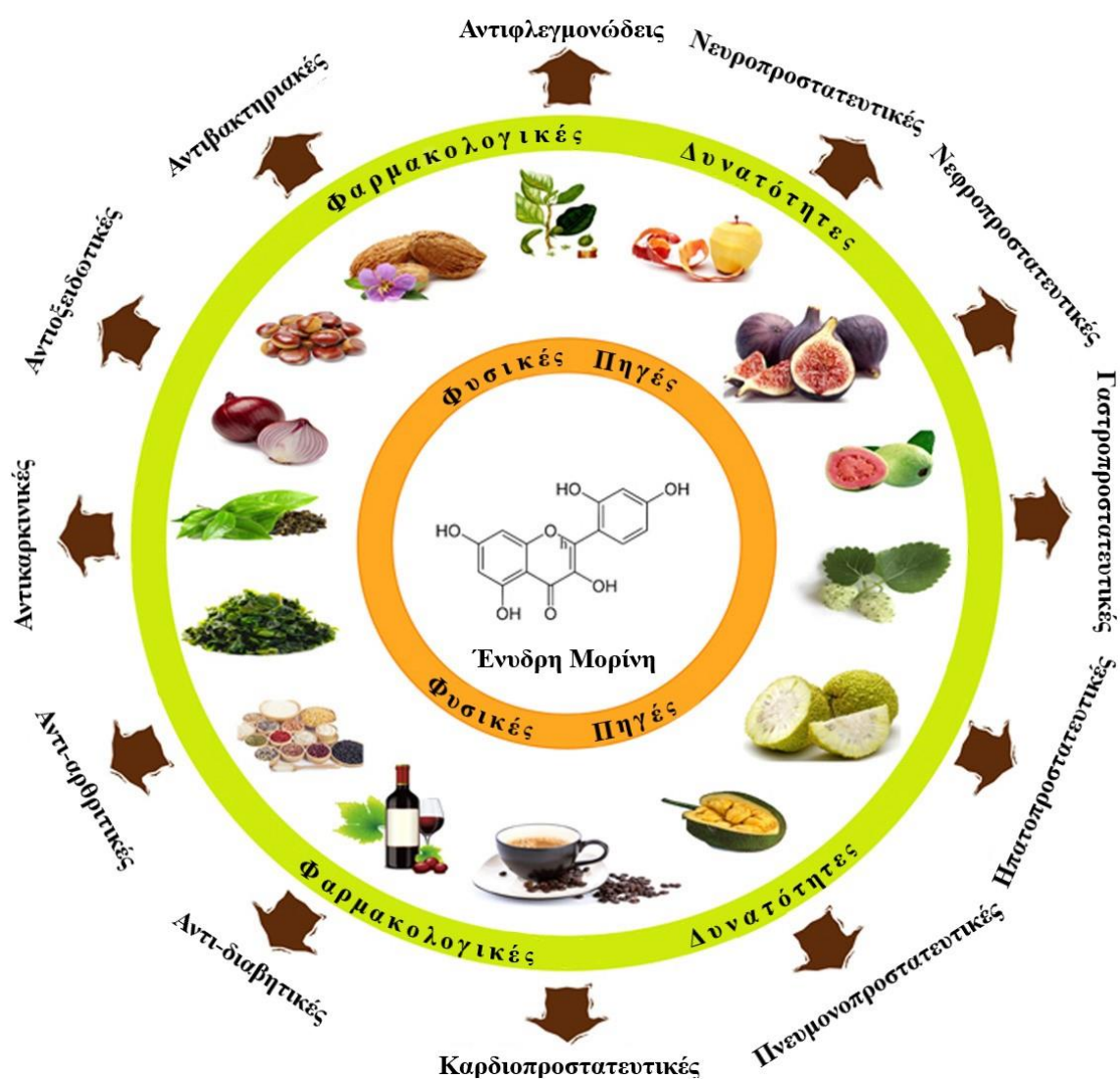


**Εικόνα 1.10:** Στην εικόνα απεικονίζεται σχηματικό διάγραμμα με τις διάφορες φυσικές πηγές της ένυδρης μορίνης (Rajput et al., 2021).

Έχει βρεθεί πως η μορίνη εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα, ωφέλιμων φαρμακολογικών επιδράσεων, αφού διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, νευροπροστατευτική, καρδιοπροστατευτική, αντιδιαβητική, ηπατοπροστατευτική, νεφροπροστατευτική, γαστροπροστατευτική, αντι-αρθριτική, αντικαρκινική (καρκίνοι όπως του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του ήπατος), αντιβακτηριακή και αντι-ική δράση (COVID-19) (Εικόνα 1.11) (Rajput et al., 2021). Ειδικότερα, οι μηχανισμοί φαρμακολογικής δράσης της μορίνης, βασίζονται σε διαδικασίες όπως η δέσμευση και απομάκρυνση των ΔΜΟ, η αναστολή των οξειδωτικών ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η προστασία του DNA από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες και η αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών κ.λπ (Deriabina et al., 2022). Πολλά *in vivo* και *in vitro* πειράματα αποδεικνύουν, τη σημαντική βιοδραστικότητα της μορίνης, έναντι διαφόρων απειλητικών για τη ζωή ασθενειών, με τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, να αποτελούν τους κύριους θεραπευτικούς μηχανισμούς δράσης, υπεύθυνοι για το θεραπευτικό της δυναμικό (Rajput et al., 2021). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση της μορίνης, λόγω του υψηλού



αντιοξειδωτικού της δυναμικού, προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά μέρη, από την οξείδωση, απομακρύνοντας τις ΔΜΟ. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό της, οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη του διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων (C2-C3) αλλά και της υδροξυλομάδας, η οποία ενεργοποιεί τον διπλό δεσμό στη θέση (C-3). Επιπλέον, η αντιλιπιδική υπεροξειδωτική δράση της μορίνης, φαίνεται να οφείλεται στην ύπαρξη των δύο υδροξυλομάδων, στις θέσεις (C-2') και (C-4') του δακτυλίου Β (Rajput et al., 2021).



**Εικόνα 1.11:** Στην εικόνα απεικονίζεται σχηματικό διάγραμμα με τις διάφορες φυσικές πηγές της ένυδρης μορίνης καθώς και τις φαρμακολογικές της δυνατότητες (Rajput et al., 2021).

Όσον αφορά τη μορίνη και την HSP70, προς το παρόν δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα ερευνητικά δεδομένα, τόσο στην ελληνική όσο και στη διεθνή βιβλιογραφία, που να αποδεικνύουν κάποιο ανασταλτικό ή επαγωγικό μηχανισμό δράσης της μορίνης έναντι της HSP70 ή και κάποιας άλλης κατηγορίας πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Επομένως, στη συγκεκριμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δεν αναφέρονται ερευνητικά δεδομένα που να συνδέουν τη μορίνη με την HSP70, όπως αντίθετα συμβαίνει με τη φισετίνη. Η μορίνη, σε γενικότερο πλαίσιο, αποτελεί φλαβονοειδές το οποίο βρίσκεται υπό διερεύνηση και πολλοί μηχανισμοί δράσης της, δεν έχουν ακόμη, διαλευκανθεί πλήρως. Παρόλα αυτά, τόσο η μορίνη όπως και η φισετίνη, αλλά και όλα τα φλαβονοειδή, στο μέλλον προβλέπεται να αποτελέσουν σημαντικούς φαρμακολογικούς, και όχι μόνο, στόχους της ερευνητικής κοινότητας.

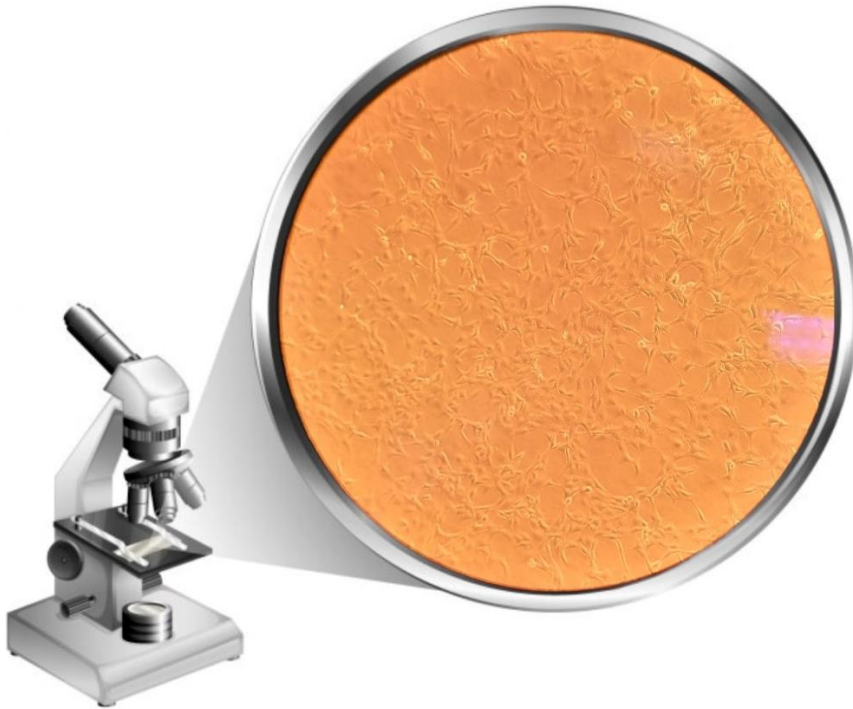
## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Κυτταροκαλλιέργεια Κυτταρικών Σειρών

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε, στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο κυτταροκαλλιέργειας, ο οποίος διατηρείται στείρος μικροβίων, με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, τόσο εντός κύριου χώρου της κυτταροκαλλιέργειας, όσο και εκτός, δηλαδή στον προθάλαμο προετοιμασίας για την είσοδο στον κύριο χώρο του εργαστηρίου. Με στόχο να αποτραπούν οι επιμολύνσεις στις κυτταρικές σειρές, ο χειρισμός και η επεξεργασία τους, πραγματοποιήθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες, εντός του κατάλληλου εργαστηριακού θαλάμου κυτταροκαλλιέργειας, κάθετης νηματικής ροής (FASTER BHA 48). Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο (Model 311, Forma Scientific), σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, διατηρώντας τις απαραίτητες συνθήκες υγρασίας και με σταθερή παροχή CO<sub>2</sub> σε ποσοστό 5%. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία (Petri) διαμέτρου 10cm ή πολυτρυβλία πολυστυρενίου μιας χρήσης, βάση του πρωτοκόλλου τα οποίο έχει προταθεί από τον (ATCC:American Type Culture Collection), ενώ η μικροσκοπική παρατήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Olympus CK2). Τέλος, για την μακροπρόθεσμη αποθήκευση των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο, με θερμοκρασία (-192°C). Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω.

#### 2.1.1 Κυτταρική Σειρά NIH/3T3

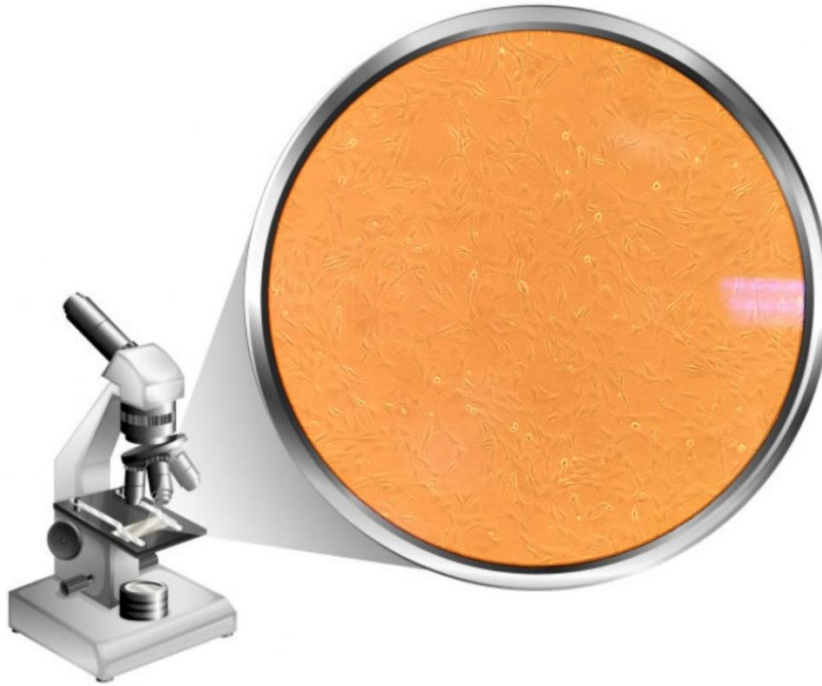
Η κυτταρική σειρά NIH/3T3, αποτελεί μία κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών, η οποία απομονώθηκε από έμβρυο ελβετικού αλφικού μύος (Swiss Albino Mouse). Η απομόνωση της αρχικής κυτταρικής σειράς, πραγματοποιήθηκε το 1962, στο Τμήμα Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης, από τους George Todaro και Howard Green. Ο χαρακτηρισμός «3T3» αποδίδεται στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, το αποκαλούμενο «πρωτόκολλο 3T3». Έκτοτε, η κυτταρική σειρά 3T3 αποτελεί την κυριότερη κυτταρική σειρά ινοβλαστών (Todaro & Green, 1963).



**Εικόνα 2.1:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι κυτταρικές δομές των κυττάρων NIH/3T3, τα κύτταρα βρίσκονται προσκολλημένα στο ταπήτιο του τρυβλίου. Πρόκειται για εικόνα του οπτικού μικροσκοπίου (B1 Advanced Series, Motic), η οποία λήφθηκε από κάμερα κινητού τηλεφώνου, στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων.

### 2.1.2 Κυτταρική Σειρά Tg/Tg

Η κυτταρική σειρά Tg/Tg, αποτελεί μία αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά εμβρυϊκών κυττάρων μυός. Τα κύτταρα της σειράς Tg/Tg, εμφανίζουν το χαρακτηριστικό της υπερέκφρασης της HSP70. Ειδικότερα, οι πρωτογενείς καλλιέργειες των κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, από έμβρυα διαγονιδιακών μυών, τα οποία διέθεταν την ικανότητα της υπερέκφρασης της HSP70.



**Εικόνα 2.2:** Στην εικόνα απεικονίζονται οι κυτταρικές δομές των κυττάρων Tg/Tg, τα κύτταρα βρίσκονται προσκολλημένα στο ταπήτιο του τρυβλίου. Πρόκειται για εικόνα του οπτικού μικροσκοπίου (B1 Advanced Series, Motic), η οποία λήφθηκε από κάμερα κινητού τηλεφώνου, στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων.

## 2.2 Υλικά Κυτταροκαλλιέργειας

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose, D6429, Sigma-Aldrich®
2. Phosphate Buffer Saline (PBS), P4417, Sigma-Aldrich®
3. Trypsin-EDTA 1X - L0940-500, Biowest
4. Penicillin-Streptomycin, L0022-020, Biowest
5. L-Glutamine, X0550-100, Biowest
6. Fetal bovine serum (FBS), P40-37500, PAN BIOTECH
7. Αποστειρωμένα Τρυβλία Καλλιέργειας Κυττάρων Petri, VENTS, CELLSTAR® TC, STERILE, 15 PCS./BAG 17
8. Γυάλινες Πιπέτες (Pasteur Pipettes) με ανοιχτό άκρο, ISOLAB Laborgeräte GmbH
9. Αποστειρωμένα Πλαστικά Σιφώνια (Pipettes) των 5, 10 και 25 mL, Stripette Serological Pipets, Corning® Costar®
10. Πλαστικά Σωληνάρια Τύπου Falcon των 15 και 50 mL, Cellstar® Tubes
11. Σωληνάρια Φυγοκέντρησης (Eppendorf Tubes)
12. Κρυοφιαλίδια Ψύξης (Cryovials) του 1,5 mL, Greiner Bio-one

13. Πλαστικά Ρύγχη Πιπετών (Pipette Tips)

14. Πλάκα Neubauer/Αιμοκυτταρόμετρο

### 2.2.1 Θρεπτικό Υλικό Κυττάρων

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε, τόσο για την κυτταρική σειρά NIH/3T3 όσο και για την κυτταρική σειρά Tg/Tg, είναι κοινό και συγκεκριμένα πρόκειται για το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-High Glucose), D6429 της Sigma. Πριν τη χρήση του θρεπτικού μέσου στις κυτταροκαλλιέργειες, το θρεπτικό υπόκειται κατάλληλη επεξεργασία, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Ειδικότερα, στη φιάλη του θρεπτικού, προστίθενται οι απαραίτητες αντιβιοτικές ουσίες όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη, αλλά και ουσίες ενίσχυσης της ανάπτυξης των κυττάρων όπως γλουταμίνη και ορός βοδιού (FBS). Η τεχνική της παρασκευής πλήρους θρεπτικού υλικού είναι η ακόλουθη: Σε φιάλη (DMEM) του εμπορίου με όγκο 500 mL, προστίθενται σε άσηπτες συνθήκες, 5 ml γλουταμίνης, 5 ml αντιβιοτικής ουσίας και 50 mL ορός βοδιού, με τον τελικό όγκο του διαλύματος να είναι τα 560 mL. Οι αναλογίες κάθε πρόσθετης ουσίας, έχουν υπολογιστεί ως προς τον αρχικό όγκο του θρεπτικού, και αποτελούν το 1%, 1% και 10% αντίστοιχα. Τέλος, μετά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού, η φιάλη φυλάσσεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C.

### 2.2.2 Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης (PBS)

Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης, αποτελεί ένα ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS: Phosphate-Buffered Saline), το οποίο χρησιμοποιείται για την έκπλυση των κυττάρων από το θρεπτικό υλικό τους, από τυχόν νεκρά κύτταρα ή άλλα κυτταρικά υπολείμματα, αλλά και από πρόσθετες ουσίες με τις οποίες τυχόν επώαστηκαν τα κύτταρα, με σκοπό να ακολουθήσουν τα επιμέρους πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν κατά την επεξεργασία τους. Η τεχνική της παρασκευής του Ρυθμιστικού Διαλύματος (PBS), περιλαμβάνει τη διάλυση ενός δισκίου Phosphate Buffered Saline της εταιρείας Sigma, σε 200 mL δις-απεσταγμένου ύδατος (ddH<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύεται ώστε να διαλυθεί πλήρως το δισκίο, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και αποθηκεύεται στο ψυγείο στους 4°C.

### 2.2.3 Ορός (FBS)

Ο ορός (FBS: Fetal Bovine Serum), αποτελεί εμβρυϊκό ορό αίματος βοοειδών, ο οποίος προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων (DMEM), πριν από τη πρώτη χρήση, με την τελική του συγκέντρωση να ανέρχεται στο 10% του συνολικού όγκου του θρεπτικού. Ο εμπλουτισμός του θρεπτικού με τον ορό (FBS), αποτελεί αναγκαία διαδικασία, καθώς έτσι το θρεπτικό μέσο, αποκτά τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τέλος, ορός (FBS) καταψύχεται και αποθηκεύεται σε άσηπτες συνθήκες.

### 2.2.4 Διάλυμα Θρυψίνης/EDTA

Το διάλυμα Θρυψίνης/EDTA (Trypsin-EDTA 1X) της Biowest, αποτελεί διάλυμα ελλειμματικό σε ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ , το οποίο χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου ή του πολυτρυβλίου, όπου τα κύτταρα είναι προσκολλημένα και σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές δομές τους. Η ποσότητα του διαλύματος θρυψίνης που προστίθεται σε κάθε τρυβλίο, υπολογίζεται περίπου ως 10% του τελικού όγκου του τρυβλίου, και στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο όγκος θρυψίνης ανέρχεται στο 1 mL. Η τεχνική που ακολουθείται είναι η εξής: Αρχικά, αφαιρείται το υπερκείμενο από το τρυβλίο, έπειτα προστίθεται 1 mL θρυψίνης, και ακολουθεί τοποθέτηση του τρυβλίου σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C για χρονικό διάστημα 2 λεπτών. Η επώαση είναι απαραίτητη και στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τρυβλίου, και να επιτευχθεί η δημιουργία του κυτταρικού εναιωρήματος. Το διάλυμα θρυψίνης, φυλάσσεται και αυτό στο ψυγείο στους 4°C.

### 2.2.5 Εξοπλισμός και Όργανα

1. Θάλαμος Κάθετης Νηματικής Ροής με Λάμπα UV και Φίλτρο HEPA, FASTER BHA 48
2. Επωαστικός Κλίβανος με σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO<sub>2</sub>, Model 311, Forma Scientific
3. Επωαστικός Κλίβανος με σταθερή θερμοκρασία 37°C και παροχή 5% CO<sub>2</sub>, Galaxy B, RS Biotech
4. Οπτικό Μικροσκόπιο (Αντίθετης Φάσης), Olympus CK2
5. Οπτικό Μικροσκόπιο, B1 Advanced Series, Motic
6. Φυγόκεντρος, Hettich Rotofix 32

7. Στροβιλοποιητικός Αναδευτήρας (Vortex), Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
8. Υδατόλουτρο, Memmert GmbH & Co.KG
9. Ηλεκτρικός Αναρροφητήρας για σιφώνια, Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG
10. Μηχανικές Πιπέτες άντλησης και έγχυσης (0.5-10, 2-20, 20-200, 100-1000  $\mu$ L), Orange Scientific
11. Μηχανική Πολυκάναλη Πιπέτα (8 Καναλιών: 20-200  $\mu$ L), Transferpette®- 8, BrandTech™
12. Μηχανική Μικροπιπέτα (0.5 to 10  $\mu$ L), Optipette OP10, HTL Lab Solutions
13. Αναλυτικός Ζυγός Ακριβείας, KERN & SOHN GmbH
14. Κυτταρόμετρο Ροής, CyFlow ML®, Sysmex-Partec GmbH

### 2.3 Ανάπτυξη και Διατήρηση Κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές, αποθηκεύονται σε ειδικά κρυσταλλικά ψύξης (cryovials) του 1,5 mL, σε δοχείο υγρού αζώτου, το οποίο βρίσκεται σε κατάλληλα διαμορφωμένο ψυχόμενο χώρο, με θερμοκρασία (-192°C). Για τη χρήση των κυττάρων στα πειραματικά πρωτόκολλα, προηγείται η κατάλληλη επεξεργασία τους, με την τεχνική που ακολουθείται να περιγράφεται ως εξής: Αρχικά, πραγματοποιείται η απόψυξη των κυττάρων που περιέχονται στα κρυσταλλικά, με την τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια, ακολουθεί η τοποθέτηση των κυττάρων σε αποστειρωμένο τρυβλίο, όπου ήδη έχουν προστεθεί 10mL (DMEM-High Glucose) και 100  $\mu$ L γλουταμίνης (L-Glutamine 100X). Ακολούθως, το τρυβλίο τοποθετείται σε θερμοστατούμενο επωαστικό κλίβανο, στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Η ανάπτυξη των κυττάρων παρακολουθείται τις επόμενες ημέρες με οπτική παρατήρηση, στο μικροσκόπιο, με την εικόνα της πλήρους κάλυψης του ταπητίου του τρυβλίου από τις κυτταρικές δομές, να σηματοδοτεί την ανάγκη για ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η τεχνική της ανακαλλιέργειας των κυττάρων είναι η εξής:

1. Αφαίρεση υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο.
2. Προσθήκη 10 mL (PBS), ήπια ανακίνηση του τρυβλίου και αναρρόφηση του (PBS), για την απομάκρυνση τυχόν νεκρών κυττάρων ή άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων.
3. Προσθήκη 1 mL διαλύματος (Trypsin-EDTA 1X) και επώαση στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για 2 λεπτά, για αποκόλληση των κυττάρων.
4. Παρατήρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η αποκόλλησή τους από το τρυβλίο.
5. Προσθήκη 10 mL (DMEM High Glucose) για αδρανοποίηση της θρυψίνης.



6. Συλλογή κυτταρικού εναιωρήματος σε σωληνάριο (falcon), και μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού, με τη χρήση Πλάκας Neubauer-Αιμοκυτταρόμετρο.
7. Τοποθέτηση επιθυμητού αριθμού κυττάρων στο τρυβλίο, και απόρριψη του υπόλοιπου εναιωρήματος.
8. Προσθήκη απαραίτητου όγκου (DMEM High Glucose) στο τρυβλίο, μέχρι ο τελικός όγκος του τρυβλίου να φτάσει τα 10 mL.
9. Επανατοποθέτηση του τρυβλίου στον επωαστικό κλίβανο.

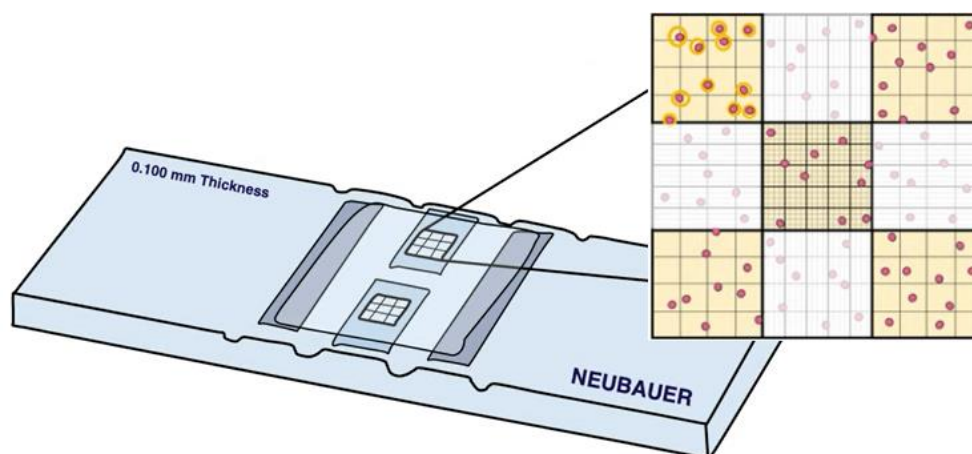
Σε χρονικό διάστημα περίπου δύο με τριών ημερών, ο πυθμένας του τρυβλίου καλύπτεται πλήρως από τις αναπτυσσόμενες κυτταρικές δομές, και έτσι διεξάγεται εκ νέου η παραπάνω διαδικασία της ανακαλλιέργειας, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος και να επιτευχθεί η φυσιολογική ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού.

#### 2.4 Μέτρηση Αριθμού Κυττάρων

Ο προσδιορισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων, τόσο στον συνολικό όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος, όσο και στο 1 mL αυτού, πραγματοποιείται με τη χρήση Πλάκας Neubauer/Αιμοκυτταρόμετρο. Η τεχνική της μέτρησης του αριθμού των κυττάρων είναι η εξής:

1. Αφαίρεση υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο.
2. Προσθήκη 10 mL (PBS), ήπια ανακίνηση του τρυβλίου και αναρρόφηση του (PBS), για την απομάκρυνση τυχόν νεκρών κυττάρων ή άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων.
3. Προσθήκη 1 mL διαλύματος (Trypsin-EDTA 1X) και επώαση στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για 2 λεπτά, για αποκόλληση των κυττάρων.
4. Παρατήρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η αποκόλλησή τους από το τρυβλίο.
5. Προσθήκη 10 mL (DMEM High Glucose) για αδρανοποίηση της θρυψίνης.
6. Ανάδευση και ομογενοποίηση του κυτταρικού εναιωρήματος, με ήπια επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση και έγχυση του δείγματος στο τρυβλίο, ώστε να διασπαστούν τυχόν ορατά κυτταρικά συσσωματώματα.
7. Συλλογή κυτταρικού εναιωρήματος σε σωληνάριο (falcon) των 15 mL.
8. Τοποθέτηση 11  $\mu$ L του κυτταρικού εναιωρήματος στην Πλάκα Neubauer-Αιμοκυτταρόμετρο.

9. Τοποθέτηση της Πλάκας Neubauer-Αιμοκυτταρόμετρο στο οπτικό μικροσκόπιο (σκοτεινού πεδίου) και μέτρηση των κυττάρων, στα τέσσερα κατάλληλα οπτικά πεδία της πλάκας (4 μεγάλα τετράγωνα).
10. Υπολογισμός του συνολικού αριθμού των κυττάρων, στον ολικό όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος π.χ. 10 mL, βάση του τύπου:  $\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ} = (\text{Μ.Ο ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ 4 ΠΕΔΙΑ}) \times (\text{ΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ}) \times 10.000$  (ΣΤΑΘΕΡΑ).



**Εικόνα 2.3:** Στην εικόνα παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση της Πλάκας Neubauer-Αιμοκυτταρόμετρο καθώς και τα τέσσερα οπτικά πεδία στα οποία πραγματοποιείται η καταμέτρηση των κυττάρων.

## 2.5 Κρυοσυντήρηση και Αποθήκευση Κυττάρων

Η μακροχρόνια αποθήκευση και κρυοσυντήρηση των κυττάρων για μελλοντική χρήση, πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών κρυοφιαλιδίων ψύξης (cryovials) του 1,5 mL, σε δοχείο υγρού αζώτου, το οποίο βρίσκεται σε κατάλληλα διαμορφωμένο ψυχόμενο χώρο, με θερμοκρασία (-192°C). Η τεχνική της κρυοσυντήρησης των κυττάρων περιγράφεται ως εξής:

1. Αφαίρεση υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο.
2. Προσθήκη 10 mL (PBS), ήπια ανακίνηση του τρυβλίου και αναρρόφηση του (PBS), για την απομάκρυνση τυχόν νεκρών κυττάρων ή άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων.
3. Προσθήκη 1 mL διαλύματος (Trypsin-EDTA 1X) και επώαση στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για 2 λεπτά, για αποκόλληση των κυττάρων.
4. Παρατήρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η αποκόλλησή τους από το τρυβλίο.

5. Προσθήκη 5 mL (DMEM High Glucose) για αδρανοποίηση της θρυψίνης.
6. Συλλογή κυτταρικού εναιωρήματος σε σωληνάριο (falcon), και μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού, με τη χρήση Πλάκας Neubauer-Αιμοκυτταρόμετρο.
7. Φυγοκέντρηση κυτταρικού εναιωρήματος σε σωληνάριο (falcon), για 5 λεπτά στις 3000 στροφές (rpm).
8. Απόρριψη του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από το σωληνάριο (falcon).
9. Επαναιώρηση κυτταρικού ιζήματος με ορό (FBS) 90% και (DMSO: Dimethyl Sulfoxide) 10% σε τελικό όγκο 1,5 mL ανά 1.5-2 εκατομμύρια κύτταρα.
10. Τοποθέτηση του κυτταρικού εναιωρήματος στα αποστειρωμένα κρυοφιαλίδια ψύξης (cryovials), υπό στείρες συνθήκες, και αναγραφή στοιχείων, όπως ο κυτταρικός τύπος και η ημερομηνία ψύξης.
11. Τοποθέτηση των κρυοφιαλιδίων αρχικά, σε ψυγείο βαθιάς ψύξης στους (-80°C) για 24 ώρες.
12. Τέλος, μεταφορά και αποθήκευση των κρυοφιαλιδίων στο δοχείο του υγρού αζώτου στους (-192°C).

## 2.6 Φισετίνη

Η φισετίνη εμπορίου (3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone, T0121, Tokyo Chemical Industry), βρίσκεται σε λυοφιλοποιημένη στερεή μορφή, και απαιτείται ανασύσταση για τη χρήση της στα πειραματικά πρωτόκολλα. Επομένως, πριν τη χρήση της στα πειράματα, η στερεή φισετίνη, διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL διαλύτη (DMSO) με την τελική της συγκέντρωση να είναι 14 mg/mL.

## 2.7 Μορίνη

Η μορίνη εμπορίου (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone Hydrate, P0041, Tokyo Chemical Industry), βρίσκεται σε λυοφιλοποιημένη στερεή μορφή, και απαιτείται ανασύσταση για τη χρήση της στα πειραματικά πρωτόκολλα. Επομένως, πριν τη χρήση της στα πειράματα, η στερεή μορίνη, διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL διαλύτη (DMSO) με την τελική της συγκέντρωση να είναι 15 mg/mL.

## 2.8 Εργαστηριακές Πειραματικές Μέθοδοι

Τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν καθώς και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αναλύονται εκτενώς παρακάτω στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

### 2.8.1 Υλικά Πειραματικών Μεθόδων

1. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), M5655, Sigma-Aldrich®
2. Dimethylsulfoxid (DMSO), D/4121/PB15 Fisher Chemical
3. Crystal Violet, C3886-25G, Sigma-Aldrich®
4. Glutaraldehyde 25% aq.soln., A17876-Thermo Scientific
5. Propidium Iodide Solution, P4170, Sigma-Aldrich®
6. Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFDA),099M4068V, Sigma-Aldrich®
7. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), LM-S2034, Biosera
8. Ethanol Absolut, 107017, Supelco
9. RNase
10. Φισετίνη (3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone), T0121, Tokyo Chemical Industry
11. Ένυδρη Μορίνη (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone Hydrate), P0041, Tokyo Chemical Industry
12. Πλακίδια Κυτταροκαλλιιεργειών Επίπεδου Πυθμένα, 96 Μικροφρεατίων, Cell culture plate, 96 Well, Surface: Standard, Flat Base, 83.3924, SARSTEDT
13. Πολυτρυβλία 6 φρεατίων, Nunc™ Cell-Culture Treated Multidishes, 140675, Thermo Scientific
14. Δις-απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O)

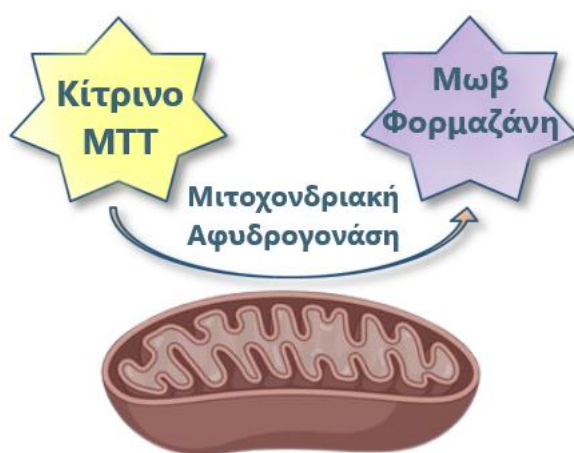
### 2.8.2 MTT Assay

Η χρωματομετρική μέθοδος MTT (MTT Colorimetric Assay), χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση και τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, και αποτελεί δείκτη κυτταρικής βιωσιμότητας, πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται στη μέθοδο MTT, είναι η ένωση (βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθιαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο ή 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), και στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, M5655) της εταιρείας Sigma-Aldrich®. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο βρίσκεται σε μορφή σκόνης, και πριν τη χρήση του στα πειραματικά

πρωτόκολλα, διαλυτοποιείται σε (PBS), αποστειρώνεται και φυλάσσεται πάντα στο ψυγείο στους 4°C, προστατευμένο από το φως καθώς είναι φωτοευαίσθητο. Η αρχή της χρωματομετρική αυτής μεθόδου, στηρίζεται στην αναγωγή των διαλυτών κίτρινων αλάτων τετραζολίου, σε μη διαλυτούς μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης, διαδικασία που πραγματοποιείται μόνο στα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, το άλας τετραζολίου, διαθέτει κίτρινο χρώμα και αποτελεί μία υδατοδιαλυτή χρωστική ουσία, η οποία εμφανίζει την ιδιότητα να ανάγεται, από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των έμβιων κυττάρων. Με αυτή την αναγωγή, μεταβάλλεται το χρώμα τους άλατος, από κίτρινο σε έντονο σκούρο μωβ χρώμα, σχηματίζοντας κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται εντός των μιτοχονδρίων του κυττάρου. Καθίσταται λοιπόν σαφές, πως η αναγωγή του (MTT) πραγματοποιείται μόνο από μεταβολικώς ενεργά μιτοχονδριακά ένζυμα, και επομένως η παραγωγή των κρυστάλλων στα μιτοχόνδρια είναι γραμμικά ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι την κυτταρική βιωσιμότητα. Τα μεταβολικά προϊόντα της αντίδρασης, δηλαδή οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι φορμαζάνης, είναι μη υδατοδιαλυτοί, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την προσθήκη ενός κατάλληλου διαλύτη για τη διαλυτοποίησή τους, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), με σκοπό να καταστεί εφικτή η ποσοτική μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η ποσοτική μέτρηση των αποτελεσμάτων, υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά, με τα μήκη κύματος να κυμαίνονται στα 690nm για το κίτρινο χρώμα του τετραζολίου, και στα 540nm για το μωβ χρώμα, των κρυστάλλων φορμαζάνης. Επομένως, το αποτέλεσμα της μετρούμενης απορρόφησης κάθε δείγματος, είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της χρωστικής που παράχθηκε, η οποία ακολούθως είναι ανάλογη με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων. Πρακτικά αυτό σημαίνει, πως όσο πιο έντονο σκούρο μωβ χρώμα διαθέτει ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας υπάρχει σε αυτό. Επομένως, με αυτή τη μέθοδο μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά η επίδραση ενός χημικού και όχι μόνο παράγοντα, στη βιωσιμότητα και τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, που υποδεικνύουν αναλόγως κυτταροστατικότητα ή κυτταροτοξικότητα.

Για την πειραματική εκτέλεση της μεθόδου (MTT) στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιούνται τρυβλία 96 μικροφρεατιών, όπου σε κάθε μικροφρεάτιο επιστρώνονται 5.000 κύτταρα, είτε της κυτταρικής σειράς Tg/Tg είτε της NIH/3T3, σε 100μL θρεπτικού υλικού (DMEM High Glucose). Ακολουθεί η επώαση των κυττάρων, χρονικού διαστήματος 24 ωρών, σε επωαστικό κλίβανος στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, και αφού ολοκληρωθεί η επώαση, πραγματοποιείται η προσθήκη των φλαβονοειδών ουσιών (φισετίνη και μορίνη) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Τα μικροφρεάτια έπειτα συμπληρώνονται με επιπλέον 100 μL θρεπτικού υλικού (DMEM High Glucose) έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε μικροφρεατίου να φτάσει στα 200 μL. Τα κύτταρα επωάζονται με τις υπό διερεύνηση ουσίες, για 24 ή 48 ώρες, ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόζουμε.

Μετά το χρονικό διάστημα των 24 ή 48 ωρών, πραγματοποιείται προσθήκη 40μL του αντιδραστηρίου (MTT) σε όλα τα φρεάτια των δειγμάτων, και ακολουθεί εκ νέου επώαση, για 3 ώρες, στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση με (MTT), αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο από τα φρεάτια με αναρρόφηση, προσέχοντας να μην αναρροφηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που έχουν σχηματιστεί στον πυθμένα των μικροφρεατίων. Έπειτα, προστίθενται 100μL διαλύτη (DMSO), σε όλα τα μικροφρεάτια, ώστε διαλυθούν οι κρύσταλλοι που σχηματιστήκαν, αναδεύοντας ήπια και ομογενοποιώντας τους κρυστάλλους με τον διαλύτη, με τη χρήση πολυκάναλης πολυπιπέττας. Τέλος, πραγματοποιείται η φωτομέτρηση των δειγμάτων, στα 540nm και 690nm αντίστοιχα, με τη χρήση κατάλληλου φασματοφωτόμετρου.



**Εικόνα 2.4:** Στην εικόνα παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης αναγωγής του κίτρινου άλατος τετραζολίου (MTT) σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης, που πραγματοποιείται από τη μιτοχονδριακή αφυδρογονάση.

### 2.8.3 Προσδιορισμός Ικανότητας Σχηματισμού Αποικιών (Clonogenic Assay)

Η μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας σχηματισμού αποικιών αποτελεί μία κλωνογονική δοκιμασία (Colony Formation Assay ή Clonogenic Assay), μέσω της οποίας διερευνάται η ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης μεμονωμένων κυττάρων, σχηματίζοντας αποικίες, ύστερα από διάφορες επιδράσεις σε αυτά, κατά την εκτέλεση *in vitro* πειραμάτων. Ως κυτταρική αποικία, χαρακτηρίζεται μία κυτταρική δομή, η οποία συγκροτείται από τουλάχιστον 50 κύτταρα. Μέσω της τεχνική του σχηματισμού αποικιών, μελετάται η δραστικότητα των κυτταροτοξικών φαρμάκων ή άλλων ενώσεων. Για την εκτέλεση αυτής της μεθόδου, απαιτείται η επίστρωση κατάλληλου αριθμού κυττάρων σε πολυτρυβλία, αριθμός ο οποίος καθορίζεται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά, και συνήθως πρόκειται περίπου για 400-500 κύτταρα/mL ανά φρεάτιο. Ο χαμηλός αριθμός των

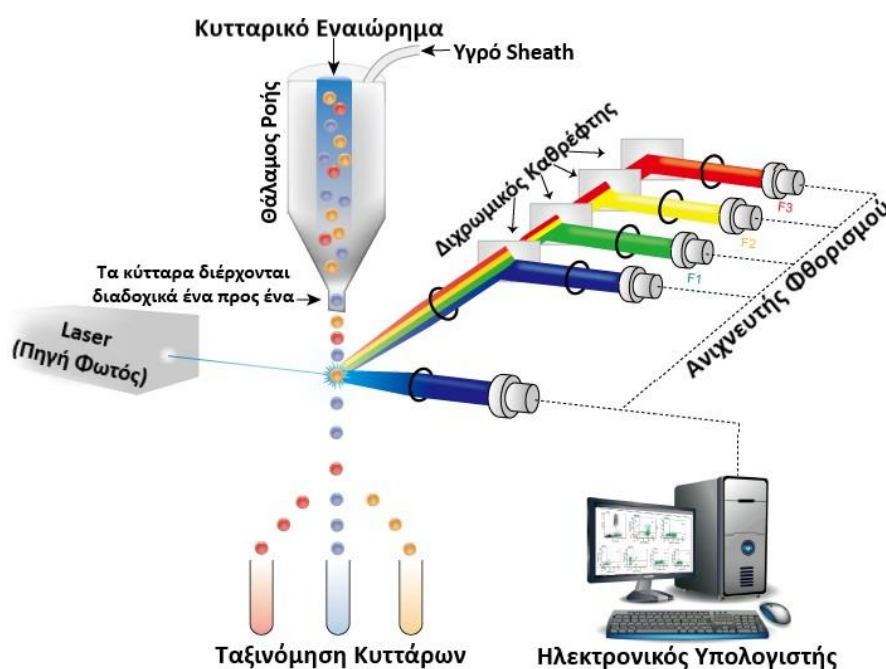
κυττάρων που επιστρώνονται ανά φρεάτιο, εξηγείται βάση του πειραματικού πρωτοκόλλου, σύμφωνα με το οποίο οι κυτταρικές αποικίες, σχηματίζονται σε καθορισμένο χρονικό διάστημα αρκετών ημερών, εντός του οποίου διερευνάται η πιθανή κυτταροτοξικότητα κάθε ουσίας. Επομένως, επειδή η μελέτη της τοξικότητας μίας ουσίας συνδέεται άμεσα με το οπτικό αποτέλεσμα της ικανότητας σχηματισμού αποικιών στο τρυβλίο, επιστρώνεται μικρός αριθμός κυττάρων, έτσι ώστε οι σχηματιζόμενες αποικίες να μην καλύψουν πλήρως το ταπήτιο του τρυβλίου, κατά το μεγάλο χρονικό διάστημα της επώασης, καθιστώντας ανέφικτη την οπτική παρατήρηση των αποικιών καθώς και τη μέτρηση των αποτελεσμάτων. Η τοξικότητα των ουσιών, προσδιορίζεται αντιπαραβάλλοντας, τον αριθμό των σχηματιζόμενων αποικιών στις οποίες έχει προστεθεί η υπό μελέτη ουσία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, με τον αριθμό των σχηματιζόμενων αποικιών των κυττάρων ελέγχου (Controls), στα οποία δεν έχει προστεθεί κάποια ουσία. Έτσι, συγκρίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των φυσιολογικών κυττάρων έναντι των κυττάρων που επώαστηκαν με ουσία. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιείται προσδιορισμός της πιθανής κυτταροτοξικότητας δύο φλαβονοειδών ουσιών, της φισετίνης και της μορίνης, σε κύτταρα δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών (Tg/Tg και NIH/3T3), με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε να περιγράφεται ως εξής. Αρχικά, επιστρώνεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων σε πολυτρυβλία των 6 φρεατίων, όπου σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 500 κύτταρα/mL, με τελικό όγκο κάθε φρεατίου τα 2mL θρεπτικού υλικού (DMEM High Glucose). Ακολουθεί επώαση 24 ωρών, στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, και έπειτα προστίθενται οι υπό μελέτη ουσίες (φισετίνη και μορίνη), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και σε διάφορους συνδυασμούς, και πραγματοποιείται εκ νέου επώαση. Μετά το πέρας 24 ωρών, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα φρεάτια των δειγμάτων, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι υπό μελέτη ουσίες, και προστίθενται εκ νέου 2 mL θρεπτικό υλικό (DMEM High Glucose), σε κάθε φρεάτιο. Αφού ολοκληρωθεί η προηγούμενη διαδικασία, πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων, σε επωαστικό κλίβανο, για χρονικό διάστημα οκτώ ημερών, εντός του οποίου παρεμβάλλεται και μία ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων. Με την ολοκλήρωση της επώασης στο διάστημα των οκτώ ημερών, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό (DMEM) από τα φρεάτια, ακολουθεί έκπλυση αυτών με (PBS) και προστίθεται στα φρεάτια, διάλυμα χρώσης 1 mL ανά φρεάτιο, το οποίο προσδίδει ιώδες χρώμα τις κυτταρικές αποικίες, σε χρόνο των 30 λεπτών. Το διάλυμα χρώσης, που χρησιμοποιείται για το χρωματισμό των κυττάρων, παρασκευάζεται με την ανάμειξη της χρωστικής Crystal Violet Dye της εταιρίας Sigma-Aldrich®, με το αντιδραστήριο Glutaraldehyde 25%, A17876 της Thermo Scientific καθώς και με δι-απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Για την παρασκευή διαλύματος όγκου 1 mL, απαιτείται ανάμειξη 0.005gr Crystal Violet, με 0,76mL (ddH<sub>2</sub>O) και 0,24 mL Glutaraldehyde 25%.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών, η χρωστική απομακρύνεται, ξεπλένοντας τα τρυβλία με νερό βρύσης, καθώς οι αποικίες είναι μονιμοποιημένες στο ταπήτιο του τρυβλίου και δεν υπάρχει κίνδυνος αποκόλλησης με το πλύσιμο. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται ανάποδα σε διηθητικό χαρτί, ώστε να στεγνώσουν με φυσικά μέσα, και έπειτα οι βαμμένες, οπτικά ορατές αποικίες καταμετρούνται, υπολογίζοντας το ποσοστό επί τοις εκατό, του αριθμού των αποικιών στις οποίες προστέθηκαν ουσίες, σε σχέση με τις αποικίες ελέγχου, στις οποίες δεν προστέθηκε κάποια ουσία.

#### 2.8.4 Κυτταρομετρία Ροής (ΚΡ)

Η Κυτταρομετρία Ροής (FC: Flow Cytometry), αποτελεί μία αυτοματοποιημένη τεχνική ποσοτικής μέτρησης και ταυτοποίησης μικροσκοπικών σωματιδίων (π.χ. κύτταρα), τα οποία εμπεριέχονται σε ένα ρέον υγρό, και διέρχονται μέσα από μια δέσμη φωτός, όπως μία εστιασμένη δέσμη λέιζερ. Η τεχνική αυτή, επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση διαφόρων φυσικών ή χημικών χαρακτηριστικών μίας μεμονωμένης κατηγορίας κυττάρων, όπως το σχετικό μέγεθος του κυττάρου, την κοκκίωση ή την εσωτερική πολυπλοκότητά του, καθώς και τη σχετική ένταση φθορισμού του. Χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική ακρίβεια και ευαισθησία, αποτελώντας μία αξιόπιστη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η αρχή της μεθόδου, βασίζεται στην ανάλυση της σκέδασης του φωτός των κυττάρων, καθώς και στο σήμα φθορισμού που αυτά εκπέμπουν. Ειδικότερα, τα κύτταρα, διέρχονται διαδοχικά ένα προς ένα, από μία προσπίπτουσα δέσμη λέιζερ, και το σκεδαζόμενο φως που προκύπτει, αλλά και ο φθορισμός, ανιχνεύονται από μία διάταξη, η οποία ανιχνεύει και συσχετίζει τα ληφθέντα σήματα, ταξινομώντας αυτά, βάση καθορισμένων ιδιοτήτων, για τις οποίες έχει ρυθμιστεί κατάλληλα ο ανιχνευτής (π.χ. μέγεθος κυττάρου, κοκκίωση κυττάρου, ένταση φθορισμού). Τέλος, μέσω ειδικού λογισμικού σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, τα σήματα ποσοτικοποιούνται και εξάγονται τα αριθμητικά αποτελέσματα. Το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιείται ονομάζεται κυτταρόμετρο, και ένα αντίστοιχο όργανο ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα πτυχιακή εργασία.





**Εικόνα 2.5:** Στην εικόνα απεικονίζεται σχηματική απεικόνιση του κυτταρομέτρου ροής.

### 2.8.5 Προσδιορισμός Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) με ΚΡ

Οι ΔΜΟ, αποτελούν προϊόντα αντιδράσεων οξειδωτικού στρες, που πραγματοποιούνται στα κύτταρα. Οι δραστικές αυτές μορφές, αποτελούν επιβλαβείς παράγοντες για την κυτταρική ομοιόσταση, και ευθύνονται για σοβαρές βλάβες και ασθένειες στους οργανισμούς. Τα κύτταρα και ευρύτερα οι οργανισμοί, έχουν αναπτύξει διάφορους ενζυμικούς ή μη, αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστασίας, οι οποίοι μετατρέπουν τις ΔΜΟ σε αδρανή μόρια τα οποία έπειτα απομακρύνουν, επιδιορθώνουν τυχόν βλάβες που προκλήθηκαν, ή εμποδίζουν το σχηματισμό των οξειδωτικών μορίων. Εκτός των κυτταρικών μηχανισμών προστασίας, διάφορες φυσικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή, αποτελούν εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια που λαμβάνονται με την τροφή, και τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να καταστέλλουν τον σχηματισμό των ΔΜΟ, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Με την Κυτταρομετρία Ροής, καθίσταται εφικτή η ποσοστιαία ποσοτικοποίηση της παραγωγής των ΔΜΟ, αλλά και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης που διαθέτουν, οι προς μελέτη ουσίες έναντι των κυττάρων.

Ο προσδιορισμός των ΔΜΟ από τις υπό μελέτη ουσίες (φισετίνη και μορίνη), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυτταρομέτρου και τη χρωστική DCFDA. Με τη χρήση της συγκεκριμένης χρωστικής, καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων, μέσω της

μέτρησης σημάτων φθορισμού. Συγκεκριμένα, η χρωστική DCFDA, αποτελεί μη φθορίζων αντιδραστήριο, το οποίο εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων, ανάγεται από τις ενδογενείς εστεράσες και έπειτα οξειδώνεται από τις ΔΜΟ, αποκτώντας έτσι την ιδιότητα να φθορίζει. Επομένως, μέσω της αύξησης της εκπομπής των σημάτων φθορισμού, διερευνάται η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων και ποσοτικοποιείται η παραγωγή των ΔΜΟ. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως εξής:

1. Επίστρωση  $150 \times 10^3$  κύτταρα/2 mL σε θρεπτικό υλικό (DMEM High Glucose), σε πολυτρυβλία των 6 φρεατίων.
2. Επώαση κυττάρων για 6 ώρες, έτσι ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο ταπήτιο των τρυβλίων, και προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών (φισετίνη και μορίνη), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς συνδυασμούς.
3. Επώαση των κυττάρων με τις υπό μελέτη ουσίες, για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους  $37^\circ\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ .
4. Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού (DMEM High Glucose), και έκπλυση με 2 mL (PBS), για την απομάκρυνση τυχόν νεκρών κυττάρων ή άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων. Η ροή εργασίας από το συγκεκριμένο βήμα και έπειτα, πραγματοποιείται εκτός του θαλάμου νηματικής ροής, καθώς δεν απαιτούνται άσηπτες συνθήκες εργασίας.
5. Προσθήκη 350μL (Trypsin-EDTA 1X) σε κάθε φρεάτιο και επώαση στους  $37^\circ\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$  για 2 λεπτά.
6. Προσθήκη 2mL (PBS) στα φρεάτια για απενεργοποίηση της θρυψίνης, και ήπια ανάδευση του κυτταρικού εναιωρήματος, με αναρρόφηση και έγχυση του διαλύματος εντός του φρεατίου, με σκοπό τη διάσπαση τυχόν κυτταρικών συσσωματωμάτων.
7. Συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος, κάθε δείγματος, σε σωληνάρια (falcon) και φυγοκέντρηση των κυττάρων, για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές (rpm).
8. Απόρριψη υπερκείμενου (PBS), και επαναιώρηση κυτταρικού ιζήματος με 2 mL διαλύματος (HBSS).
9. Μεταφορά κυτταρικού εναιωρήματος, κάθε δείγματος, σε σωληνάρια (eppendorf) χωρητικότητας 2 mL.
10. Προσθήκη 2,5 μL αντιδραστηρίου (DCFDA) και επώαση 30 λεπτών στους  $37^\circ\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ .
11. Προσθήκη 2,3 μL αντιδραστηρίου (Propidium Iodide) και μεταφορά δειγμάτων στο κυτταρόμετρο για μέτρηση.

### 2.8.6 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελεί μία αυστηρά καθορισμένη διαδοχή γεγονότων κατά την κυτταρική διαίρεση και περιλαμβάνει τις εξής φάσεις: φάση ανάπτυξης (G1), φάση διπλασιασμού του DNA (S), φάση αύξησης (G2), φάση κυτταρικής διαίρεσης (M), φάση ηρεμίας (G0). Έτσι, η μεταβολή της περιεκτικότητας του γενετικού υλικού στα κύτταρα χρησιμοποιείται, για τον εντοπισμό του σταδίου της κυτταρικής διαίρεσης στο οποίο βρίσκονται, καθώς και για την ταυτοποίησή και ποσοτικοποίησή τους, στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Πρακτικά, η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται ένα κύτταρο (δείγμα), προσδιορίζεται με τη βαφή του κυτταρικού DNA, με φθορίζουσα χρωστική, και έπειτα με τη μέτρηση της έντασης του ανάλογου εκπεμπόμενου σήματος φθορισμού. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται, με τη χρήση κυτταρόμετρου, όπου προσδιορίζεται η κατανομή των κυττάρων στη φάση (G0)/(G1) έναντι της φάσης (S), (G2)/(M). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Επίστρωση  $100 \times 10^3$  κύτταρα/2mL σε θρεπτικό υλικό (DMEM High Glucose), σε πολυτρυβλία των 6 φρεατίων.
2. Επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>.
3. Προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών (φισετίνη και μορίνη), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και σε διαφορετικούς συνδυασμούς.
4. Επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>.
5. Αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού (DMEM High Glucose), και έκπλυση με 2 mL (PBS), για την απομάκρυνση τυχόν νεκρών κυττάρων ή άλλων κυτταρικών υπολειμμάτων. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται δύο φορές. Η ροή εργασίας από το συγκεκριμένο βήμα και έπειτα, πραγματοποιείται εκτός του θαλάμου νηματικής ροής, καθώς δεν απαιτούνται άσηπτες συνθήκες εργασίας.
6. Προσθήκη 350μL (Trypsin-EDTA 1X) σε κάθε φρεάτιο και επώαση στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 2 λεπτά.
7. Προσθήκη 2mL (PBS) στα φρεάτια για απενεργοποίηση της θρυψίνης, και ήπια ανάδευση του κυτταρικού εναιωρήματος, με αναρρόφηση και έγχυση του διαλύματος εντός του φρεατίου, με σκοπό τη διάσπαση τυχόν κυτταρικών συσσωματωμάτων.
8. Συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος, κάθε δείγματος, σε σωληνάρια (falcon) και φυγοκέντρηση των κυττάρων, για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές (rpm).
9. Απόρριψη υπερκείμενου (PBS), και επαναιώρηση κυτταρικού ιζήματος με 1mL παγωμένου (Ice Cold PBS).
10. Φυγοκέντρηση των κυττάρων, για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές (rpm).

11. Απόρριψη υπερκείμενου παγωμένου (Ice Cold PBS), και επαναιώρηση κυτταρικού ιζήματος με 500  $\mu\text{L}$  παγωμένου (Ice Cold PBS).
12. Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (Ethanol Absolut), με ταυτόχρονη ανάδευση του διαλύματος σε στροβιλοποιητικό αναδευτήρα (vortex). Η αιθανόλη προστίθεται σταγόνα-σταγόνα στο σωληνάριο με τη χρήση μηχανικής πιπέτας.
13. Ψύξη των επιπωματισμένων σωληναρίων, στην κατάψυξη για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 7 ημερών.
14. Μετά το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων για 5 λεπτά στις 3.000 στροφές (rpm).
15. Απόρριψη της υπερκείμενης απόλυτης αιθανόλης, και επαναιώρηση με 950  $\mu\text{L}$  (PBS).
16. Μεταφορά κυτταρικού εναιωρήματος, κάθε δείγματος, σε σωληνάρια (eppendorf) χωρητικότητας 1,5 mL.
17. Προσθήκη 25  $\mu\text{L}$  (Propidium Iodide) και 25  $\mu\text{L}$  διαλύματος (RNase) σε κάθε (eppendorf) επώαση 30 λεπτών στους 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.
18. Μεταφορά δειγμάτων στο κυτταρόμετρο για μέτρηση.

## 2.9 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Το σύνολο των αποτελεσμάτων που επεξεργάστηκαν, εκφράζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  με σταθερή απόκλιση. Η επεξεργασία καθώς και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού πακέτου (Microsoft Excel 2010) καθώς και το πρόγραμμα (Graphpad Prism 8). Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των μέσων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα (Student's t-test). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Τα αποτελέσματα που αναλύονται παρακάτω, αφορούν ανεξάρτητες επαναλήψεις των πειραμάτων που έλαβαν χώρα και παρουσιάζονται ως μέσοι όροι με τις τυπικές αποκλίσεις. Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας των δύο κυτταρικών σειρών, και συγκεκριμένα των εμβρυικών κυττάρων μυός που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 (Tg/Tg) και των φυσιολογικών κυττάρων (NIH/3T3) που διερευνήθηκαν, μέσω της δοκιμασίας MTT. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές σειρές, υποβλήθηκαν σε δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη μελέτη της κυτταρικής επιβίωσης, έπειτα από την έκθεση τους, στις υπό μελέτη ουσίες, δηλαδή τη φισετίνη και τη μορίνη.

Κατά τη δοσοεξαρτώμενη μελέτη, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κάθε υπό μελέτη ουσίας μεμονωμένα, με τις συγκεντρώσεις να κυμαίνονται ως εξής 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ . Παράλληλα, μελετήθηκαν και δύο συνδυαστικά δοσολογικά σχήματα των ουσιών, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν ταυτόχρονα και στις δύο ουσίες, με σκοπό να διερευνηθεί πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση, των δύο αυτών φλαβονοειδών. Στο πρώτο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), με τις συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας να κυμαίνονται ως εξής 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ . Αντίθετα, στο δεύτερο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, τα κύτταρα εκτέθηκαν ταυτόχρονα, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μορίνης 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , και σε επιπλέον τη συγκέντρωση της  $\text{IC}_{50}$  φισετίνης (το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης) της φισετίνης.

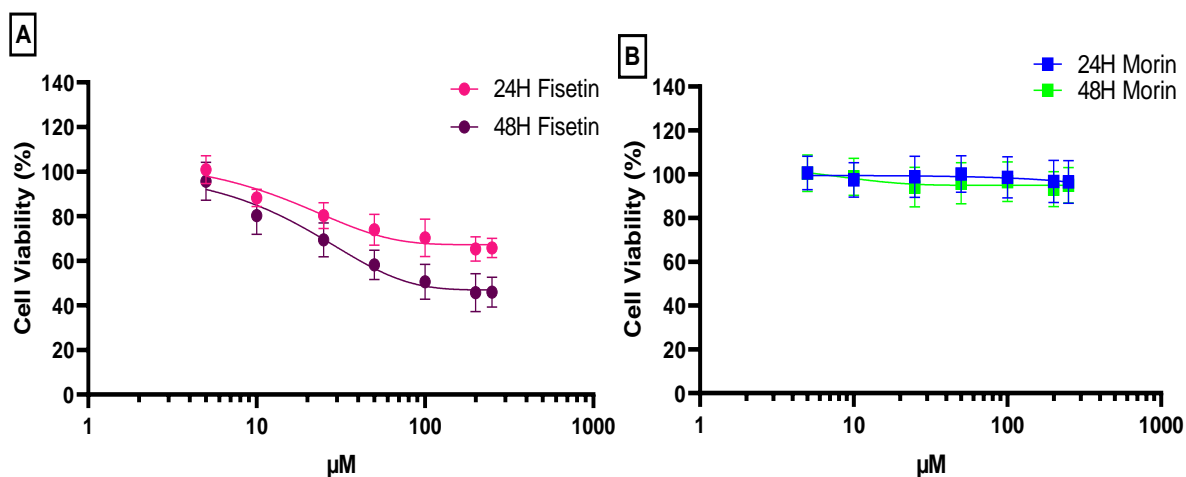
Κατά τη χρονοεξαρτώμενη μελέτη, τα κύτταρα που εκτέθηκαν στις ανάλογες συγκεντρώσεις των υπό διερεύνηση ουσιών, μελετήθηκαν σε χρονικά διαστήματα των 24 και 48 ωρών. Επομένως, στα ακόλουθα διαγράμματα, παρουσιάζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των υπό μελέτη φλαβονοειδών, που μελετήθηκε στις 24 και στις 48 ώρες.

#### 3.1.1 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα Tg/Tg

Αρχικά διερευνήθηκε η δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταρική επιβίωση των κυττάρων Tg/Tg, έπειτα από την έκθεσή τους, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, για 24 και 48 ώρες.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης στα κύτταρα Tg/Tg στις 24 και 48 ώρες, στο Γράφημα 3.1.A, η τοξικότητά της, φαίνεται να είναι τόσο δοσοεξαρτώμενη όσο και χρονοεξαρτώμενη, καθώς σε

υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , και έπειτα από 24 ώρες, η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 70% - 65% ενώ αντίθετα, στις 48 ώρες και στις ίδιες συγκεντρώσεις, το ποσοστό φτάνει στο 45%. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις της φισετίνης, τόσο σε 24 όσο και σε 48 ώρες, η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας είναι μικρή και σχεδόν αμελητέα. Όσον αφορά τη δράση της μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg στις 24 και 48 ώρες, στο Γράφημα 3.1.B, δεν παρουσιάζεται κάποια χρονοεξαρτώμενη ή δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα έναντι των κυττάρων, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας ανέρχεται σε ποσοστό 90%. Επομένως, η μορίνη δεν ασκεί κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα Tg/Tg ως τη συγκέντρωση των 250  $\mu\text{M}$ .

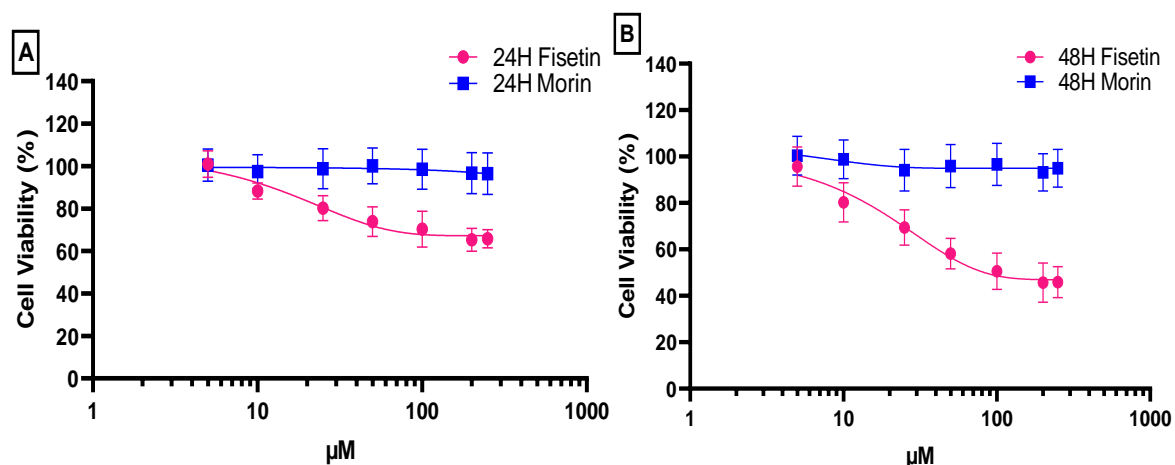


**Γράφημα 3.1:** (A) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης για 24 και 48 ώρες, (B) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίνης για 24 και 48 ώρες.

Συγκρίνοντας, τη δράση της φισετίνης με τη δράση της μορίνης, έναντι των κυττάρων Tg/Tg, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, διακρίνονται εύκολα οι κυτταροτοξικές δράσεις της φισετίνης, σε αντίθεση με τη μορίνη.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης συγκριτικά με της μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg στις 24 ώρες, Γράφημα 3.2.A, γίνεται εύκολα αντιληπτή η δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα της φισετίνης και η απουσία δραστηριότητας της μορίνης. Ειδικότερα στις 24 ώρες, σε συγκεντρώσεις φισετίνης από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , παρουσιάζεται η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 70% - 66%, ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις μορίνης, το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας ανέρχεται περίπου στο 100%. Επομένως, βάση των αριθμητικών δεδομένων, η μορίνη δε διαθέτει καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων Tg/Tg, και δεν επηρεάζεται επίσης, ούτε χρονικά αλλά ούτε και δοσολογικά.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης συγκριτικά με της μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg στις 48 ώρες, Γράφημα 3.2.B, τα αποτελέσματα της φισετίνης είναι ανάλογα με αυτά των 24 ωρών, με τη φισετίνη να παρουσιάζει σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, όπου σε συγκεντρώσεις από 50  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 60% - 45%. Αντίθετα, μετά το πέρας των 48 ωρών, φαίνεται πως η μορίνη δεν ασκεί κάποια δόσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη δράση στα κύτταρα Tg/Tg, καθιστώντας τη πρακτικά αβλαβή για τα κύτταρα.



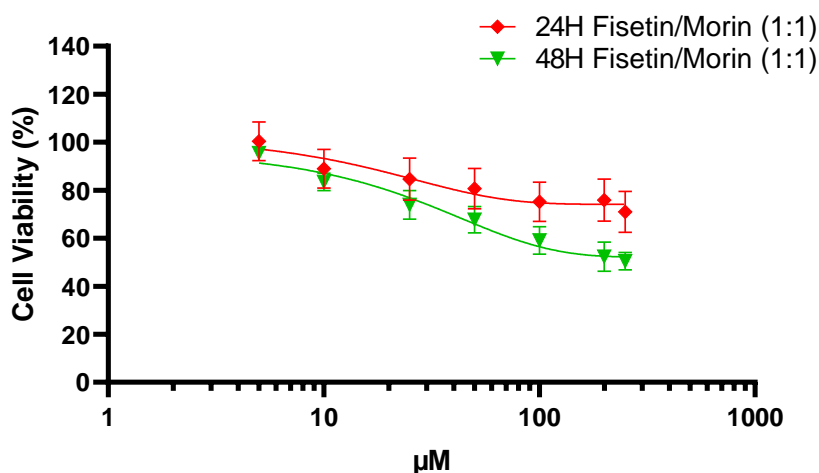
**Γράφημα 3.2:** (A) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης για 24 ώρες, (B) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης για 48 ώρες.

Στη συνέχεια, τα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, μελετήθηκαν συνδυαστικά σε δύο διαφορετικά δοσολογικά σχήματα, όπου διερευνήθηκε η ύπαρξη συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής δράσης τους, στα κύτταρα Tg/Tg. Στο πρώτο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), με τις συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας να κυμαίνονται ως εξής: 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , σε χρονική περίοδο 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πρώτου δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης, μετά το πέρας των 24 ωρών, παρατηρείται ήπια δόσοεξαρτώμενη μεταβολή της τοξικότητας, του μείγματος των ουσιών. Ειδικότερα, στις υψηλές συγκεντρώσεις του συνδυασμού των ουσιών, παρουσιάζεται κάποια μικρή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, καθώς το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων ανέρχεται στο 70%.

Αντίθετα, μετά το πέρας των 48 ωρών, στα κύτταρα Tg/Tg, εμφανίζεται δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα του μείγματος των ουσιών, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις η

μείωση της κυτταρικής επιβίωσης είναι αμελητέα, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε ικανοποιητικό βαθμό, σε ποσοστό έως 50%. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται και στο Γράφημα 3.3.



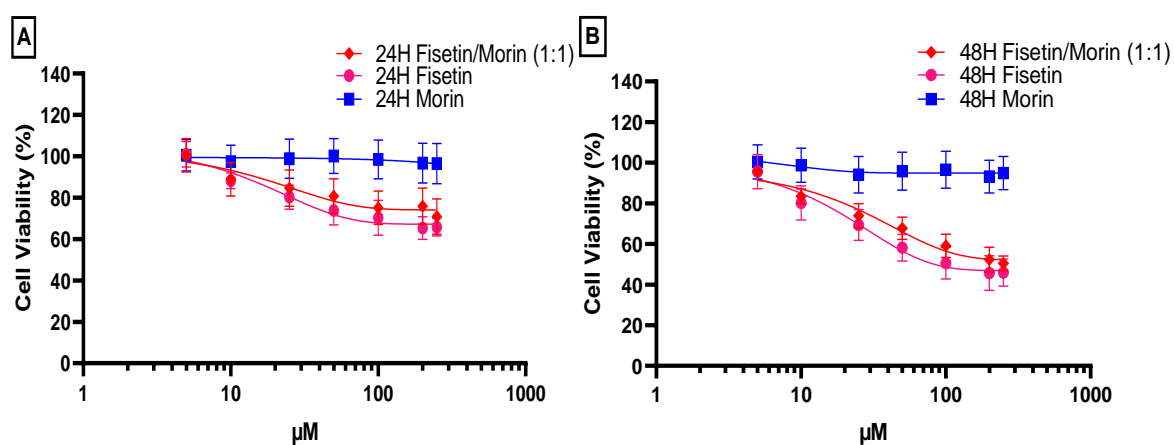
**Γράφημα 3.3:** Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας, τις δράσεις της φισετίνης, της μορίνης καθώς και του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος και των δύο ουσιών, έναντι των Tg/Tg κυττάρων, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, εξάγεται το συμπέρασμα πως μόνο η φισετίνη εμφανίζει κυτταροτοξική δράση, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, καθώς η μείωση της βιωσιμότητας οφείλεται αποκλειστικά στη δράση της.

Όσον αφορά, τις δράσεις της φισετίνης και της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος των δύο ουσιών στα κύτταρα Tg/Tg, έπειτα από 24 ώρες, η φισετίνη εμφανίζει ισχυρότερη δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 65%. Αντίθετα, στις ανάλογες συγκεντρώσεις της φισετίνης του συνδυαστικού σχήματος, παρατηρείται δοσοεξαρτώμενη μεταβολή της τοξικότητας του μείγματος των δύο ουσιών, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις, δεν παρουσιάζεται κάποια αξιοσημείωτη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις από 100 μM έως 250 μM, η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 75% - 70%. Τέλος, η μορίνη όπως ήδη έχει αναφερθεί δεν παρουσιάζει κανένα απολύτως κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, εντός των 24 ωρών.



Όσον αφορά, τις δράσεις της φισετίνης και της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος των δύο ουσιών στα κύτταρα Tg/Tg, έπειτα από 48 ώρες, η φισετίνη καθώς και το μείγμα των ουσιών, εμφανίζουν δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση, μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα σε παραπλήσια ποσοστά, όπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 50% - 45%, γεγονός που πιθανόν οφείλεται αποκλειστικά στη δράση της φισετίνης. Τέλος, η μορίνη όπως ήδη έχει αναφερθεί δεν παρουσιάζει κανένα απολύτως κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, εντός των 48 ωρών, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, ανέρχεται στο 90%.



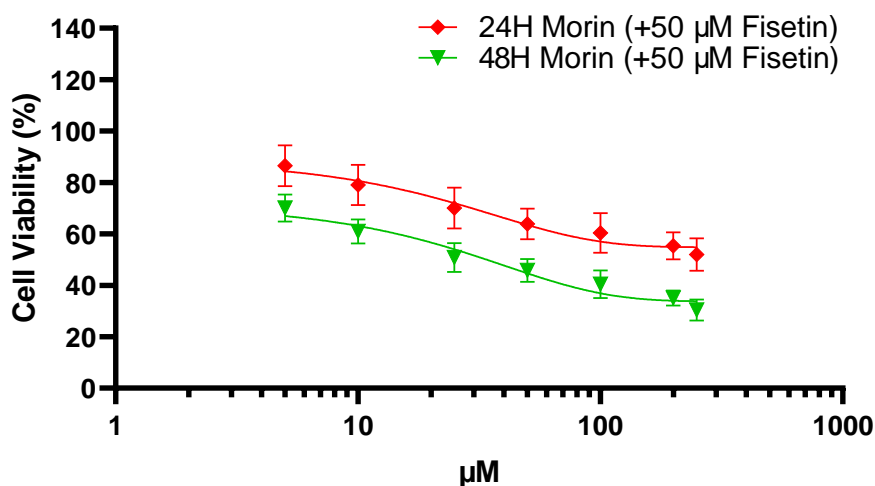
**Γράφημα 3.4:** (A) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους και στις δύο ουσίες, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της φισετίνης και της μορίνης ξεχωριστά στις 24 ώρες, (B) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους και στις δύο ουσίες, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της φισετίνης και της μορίνης ξεχωριστά στις 48 ώρες.

Έπειτα, μελετήθηκε το δεύτερο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα φισετίνης και μορίνης, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν ταυτόχρονα, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μορίνης: 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , και σε επιπλέον 50  $\mu\text{M}$  φισετίνης, ποσότητα η οποία προστέθηκε σε όλα τα δείγματα, για χρονικό διάστημα 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, και η οποία είναι η  $\text{IC}_{50}$  συγκέντρωση (το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης) της φισετίνης για διάστημα επώασης 24 και 48 ωρών, τόσο στα NIH/3T3 όσο και σε Tg/Tg κύτταρα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του δεύτερου δοσολογικού σχήματος, μείγματος φισετίνης και μορίνης, μετά το πέρας των 24 ωρών, στις υψηλές συγκεντρώσεις από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης φτάνει στο 50% (Γράφημα 3.5).

Αντίθετα, στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών, παρατηρείται εντονότερη δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα, καθώς ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 25  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ,

η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό από 50% έως και 40%. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , σημειώνεται η σημαντικότερη τοξική δράση των ουσιών έναντι των κυττάρων Tg/Tg, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 30% (Γράφημα 3.5).

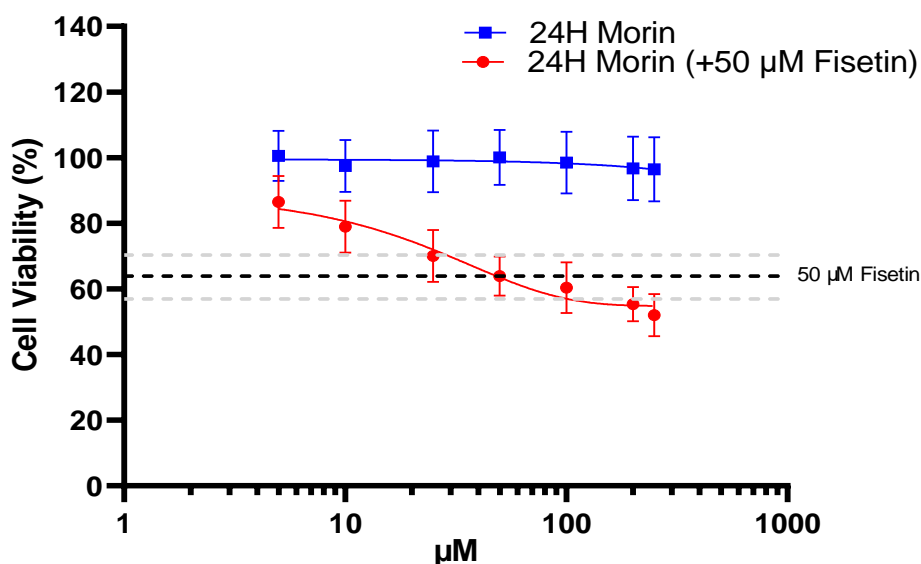


**Γράφημα 3.5:** Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης, για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα.

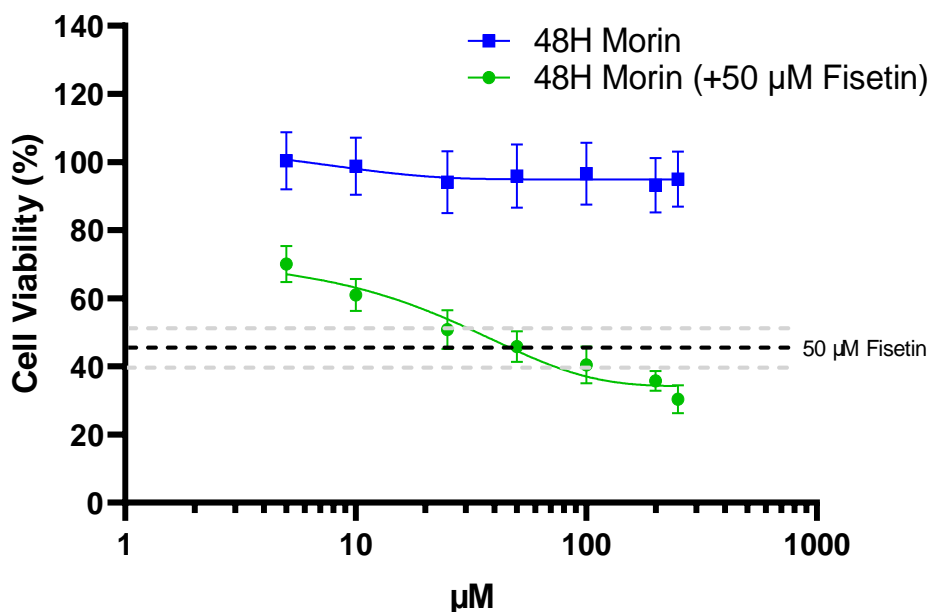
Συγκρίνοντας, τις δράσεις της φισετίνης, της μορίνης καθώς και του μείγματος ουσιών του δεύτερου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έναντι των κυττάρων Tg/Tg, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, εξάγεται το συμπέρασμα πως ο συνδυασμός των ουσιών με τη συγκέντρωση  $\text{IC}_{50}$  φισετίνης, εμφανίζει κυτταροτοξική δράση, η οποία πιθανόν εξαρτάται αποκλειστικά από τη φισετίνη. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση  $\text{IC}_{50}$  φισετίνης, η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων στο μείγμα των δύο ουσιών εμφανίζεται υψηλότερη συγκριτικά τις τιμές της κυτταρικής βιωσιμότητας έπειτα από τη μεμονωμένη έκθεση στη φισετίνη, στις ίδιες συνθήκες.

Όσον αφορά τη δράση της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του μείγματος ουσιών του δεύτερου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έναντι των κυττάρων Tg/Tg, στις 24 ώρες, το μείγμα των ουσιών εμφανίζει σημαντική κυτταροτοξική δράση, όπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , η κυτταρική βιωσιμότητα φτάνει σε ποσοστό 50%, ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις η μορίνη δεν επιφέρει κανένα κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, αφού το ποσοστό της βιωσιμότητας ανέρχεται στο 100%. Παρόλα αυτά, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των δύο ουσιών (5  $\mu\text{M}$  - 25  $\mu\text{M}$ ), η κυτταρική βιωσιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό  $\geq 70\%$ , τιμή υψηλότερη συγκριτικά με τη κυτταρική βιωσιμότητα της  $\text{IC}_{50}$  φισετίνης, η οποία ανέρχεται στο 70% (Γράφημα 3.6).

Αντιστοίχως στις 48 ώρες και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , το μείγμα ουσιών με την επιπλέον ποσότητα φισετίνης, παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας, το οποίο ανέρχεται περίπου στο 30%. Επιπλέον, η μορίνη όπως ήδη έχει αναφερθεί, στις 48 ώρες, δεν εμφανίζει καμία δοσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη τοξική δράση, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης δεν μειώνεται κάτω από το 90%. Ωστόσο, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των δύο ουσιών (5  $\mu\text{M}$  - 25  $\mu\text{M}$ ), η κυτταρική βιωσιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό  $\geq 50\%$ , τιμή υψηλότερη συγκριτικά με τη κυτταρική βιωσιμότητα της  $\text{IC}_{50}$  φισετίνης, η οποία ανέρχεται στο 50% (Γράφημα 3.7).



**Γράφημα 3.6:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεσή τους στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης, συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της μορίνης, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, +/- Τυπική Απόκλιση.



**Γράφημα 3.7:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg μετά την έκθεσή τους στη μορίνη και με επιπλέον 50μM φισετίνης, συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της μορίνης, σε χρονικό διάστημα 48 ωρών, +/- Τυπική Απόκλιση.

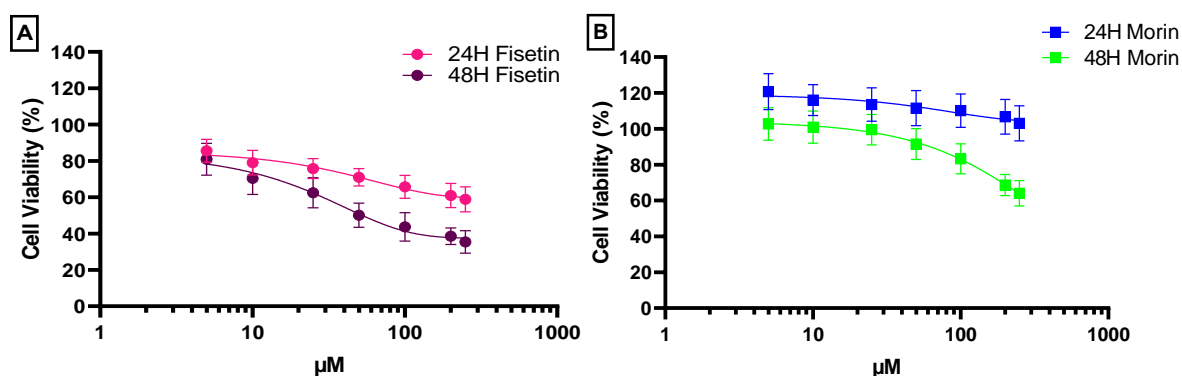
### 3.1.2 Έλεγχος Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα NIH/3T3

Αρχικά μελετήθηκε η δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταρική επιβίωση των κυττάρων NIH/3T3, έπειτα από την έκθεσή τους, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3 στις 24 και 48 ώρες, στο Γράφημα 3.8.A η τοξικότητά της, φαίνεται να είναι τόσο δόσοεξαρτώμενη όσο και χρονοεξαρτώμενη, όπου στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας (5 μM - 25 μM), τόσο σε 24 όσο και σε 48 ώρες, η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας είναι αμελητέα και στατιστικά μη σημαντική, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις 100 μM - 250 μM, και έπειτα από 24 ώρες, παρουσιάζεται μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 60% ενώ αντίθετα, στις 48 ώρες στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 50 μM - 100 μM, η μείωση είναι σημαντικά δραστικότερη και κυμαίνεται σε ποσοστό 50% - 40%. Παράλληλα στις 48 ώρες, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις φισετίνης 200 μM - 250 μM, η κυτταρική βιωσιμότητα πέφτει κάτω από το 40%, υποδεικνύοντας τη χρονοεξαρτώμενη τοξική δράση της φισετίνης έναντι των κυττάρων NIH/3T3.

Όσον αφορά τη δράση της μορίνης στα κύτταρα NIH/3T3 στις 24 και 48 ώρες, στο Γράφημα 3.8.B, στις 24 ώρες δεν παρουσιάζεται κάποια χρονοεξαρτώμενη ή δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα έναντι των κυττάρων, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας ανέρχεται στο 100%. Αντίθετα στις

48 ώρες, εμφανίζεται μία ήπια δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα της μορίνης στα κύτταρα NIH/3T3, όπου από τις χαμηλότερες κιάλας συγκεντρώσεις, εμφανίζεται κάποια μικρή μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , η μείωση είναι σημαντικά μεγαλύτερη και κυμαίνεται σε ποσοστό περίπου 60%. Επομένως, στα κύτταρα NIH/3T3, φαίνεται να δρουν και τα δύο φλαβονοειδή, με την διαφορά βέβαια πως η φισετίνη διαθέτει πιο ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι της μορίνης.



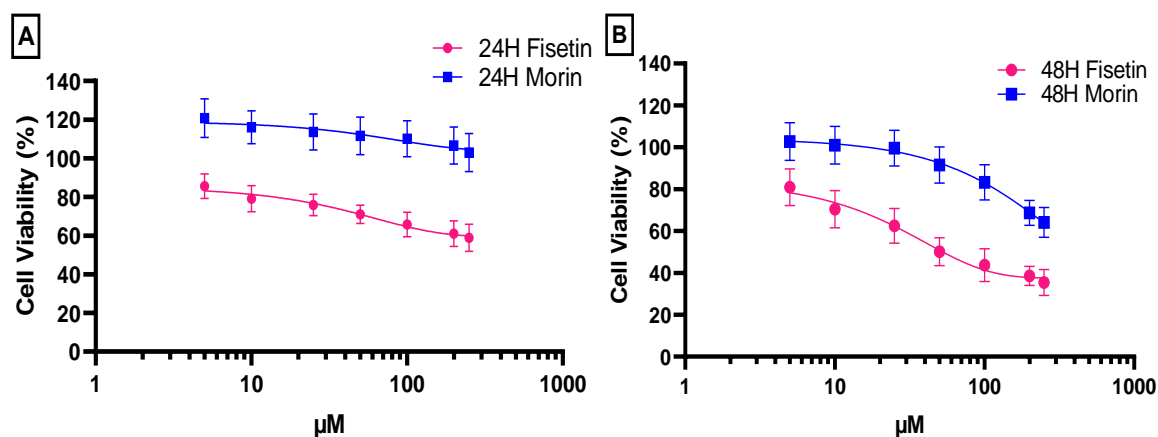
**Γράφημα 3.8:** (A) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων NIH μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης για 24 και 48 ώρες, (B) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων NIH μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίνης για 24 και 48 ώρες.

Συγκρίνοντας, τη δράση της φισετίνης με τη δράση της μορίνης, έναντι των κυττάρων NIH/3T3, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, και σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις: 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , διακρίνονται εύκολα οι ισχυρότερες κυτταροτοξικές ιδιότητες της φισετίνης, σε αντίθεση με τη μορίνη, η οποία εμφανίζει μικρότερη κυτταροτοξική δράση.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης συγκριτικά με της μορίνης στα κύτταρα NIH/3T3 στις 24 ώρες, (Γράφημα 3.9.A), γίνεται εύκολα αντιληπτή η δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα της φισετίνης και η απουσία δραστηριότητας της μορίνης. Ειδικότερα, στις 24 ώρες, σε συγκεντρώσεις φισετίνης από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , παρουσιάζεται ήπια μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 60%, ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις μορίνης 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας ανέρχεται περίπου στο 100%.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης συγκριτικά με της μορίνης στα κύτταρα NIH/3T3 στις 48 ώρες, Γράφημα 3.9.B, τα αποτελέσματα της φισετίνης είναι ευθέως ανάλογα με αυτά των 24 ωρών, με τη φισετίνη να παρουσιάζει σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, όπου σε συγκεντρώσεις από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται σε ποσοστό 40% - 35%. Αντίθετα, με βάση τα αποτελέσματα της μορίνης, μετά το πέρας των 48 ωρών, φαίνεται πως

η ουσία ασκεί ήπια δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα, όπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης μειώνεται έως στο 60%, καθιστώντας την μερικώς κυτταροτοξική για τα κύτταρα NIH/3T3.

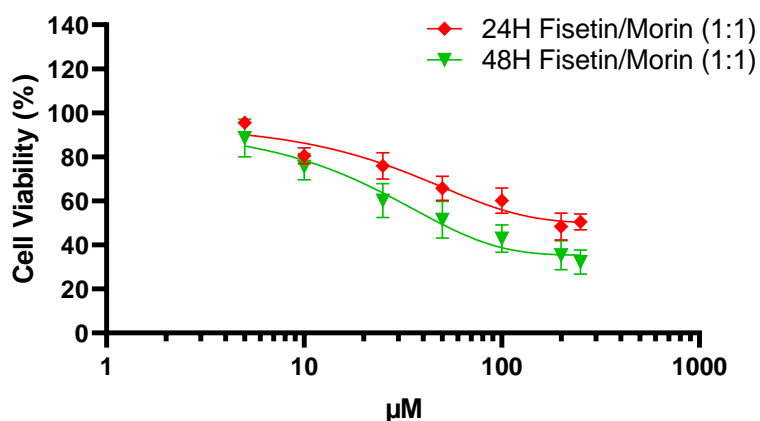


**Γράφημα 3.9:** (A) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης για 24 ώρες, (B) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την έκθεση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης για 48 ώρες.

Στη συνέχεια, τα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, μελετήθηκαν συνδυαστικά σε δύο διαφορετικά δοσολογικά σχήματα, όπου διερευνήθηκε η ύπαρξη συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής δράσης τους, στα κύτταρα NIH/3T3. Στο πρώτο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), με τις συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας να κυμαίνονται ως εξής: 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , σε χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πρώτου δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης, μετά το πέρας των 24 ωρών, παρουσιάζεται χαμηλή δόσοεξαρτώμενη μεταβολή της τοξικότητας, του μείγματος των ουσιών, όπου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας κυμαίνεται στο 60% - 50% αντίστοιχα.

Αντίθετα, μετά το πέρας των 48 ωρών, στα κύτταρα NIH/3T3, εμφανίζεται ισχυρότερη δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα του μείγματος των ουσιών, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης είναι αμελητέα, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\geq 50$   $\mu\text{M}$ , η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε ποσοστό 40% (Γράφημα 3.10).



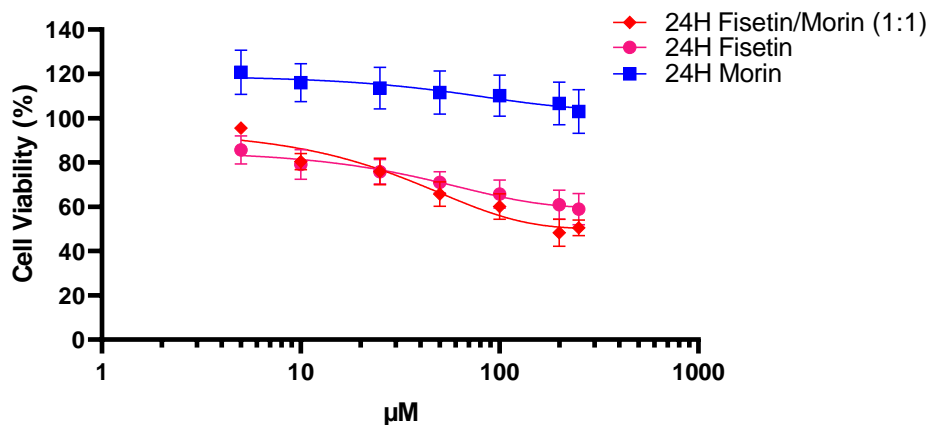
**Γράφημα 3.10:** Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας, τις δράσεις της φισετίνης, της μορίνης καθώς και του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έναντι των κυττάρων NIH/3T3, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, εξάγεται το συμπέρασμα πως τα δύο φλαβονοειδή, ενώ η μορίνη ασκεί κυτταροτοξική δράση σε δόσεις > 10 μM, ωστόσο δεν παρατηρείται συνδυαστική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μαζί με τη φισετίνη (Γράφημα 3.11 και Γράφημα 3.12).

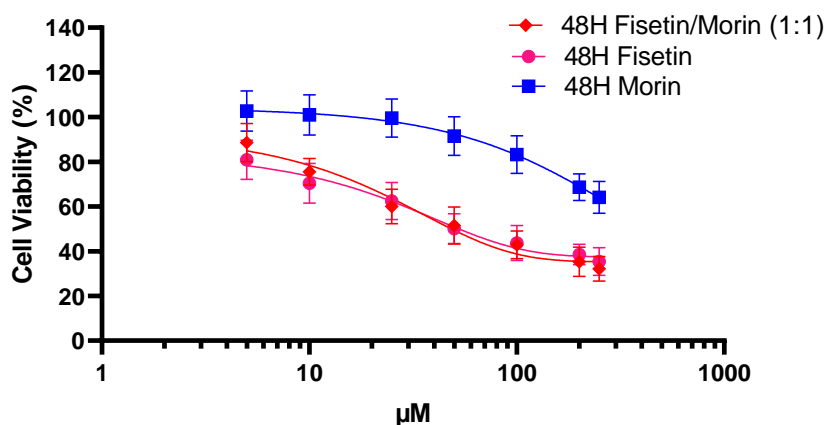
Όσον αφορά, της δράσης της φισετίνης και της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έπειτα από 24 ώρες, το μείγμα και των δύο ουσιών, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 100 μM-250 μM, εμφανίζει ισχυρότερη δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση, μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα σε ποσοστό 50%. Αντίθετα, στις ίδιες συγκεντρώσεις φισετίνης, η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται έως 60%, ποσοστό υψηλότερο συγκριτικά με το ποσοστό του συνδυασμού των φλαβονοειδών. Τέλος, η μορίνη στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών δεν παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση, αφού τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης ανέρχονται σχεδόν στο 100% (Γράφημα 3.11).

Όσον αφορά, τις δράσεις της φισετίνης και της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έπειτα από 48 ώρες, η φισετίνη και το συνδυαστικό σχήμα των δύο ουσιών, εμφανίζουν παραπλήσια κυτταροτοξικά αποτελέσματα, όπου στις συγκεντρώσεις από 100 μM έως 250 μM, τα ποσοστά της κυτταρικής βιωσιμότητας είναι σχεδόν πανομοιότυπα 40% - 30%. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανόν οφείλεται στην χρονοεξαρτώμενη δραστηριότητα της φισετίνης, η οποία αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο, και προκαλεί ανάλογη κυτταροτοξική δράση με το μείγμα και των δύο ουσιών. Τέλος, η μορίνη όπως ήδη έχει αναφερθεί και παραπάνω, μετά το πέρας των 48 ωρών, φαίνεται πως ασκεί ήπια δόσοεξαρτώμενη και

χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , όπου το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης μειώνεται έως στο 60% (Γράφημα 3.12).



**Γράφημα 3.11:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της φισετίνης και της μορίνης ξεχωριστά, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών.

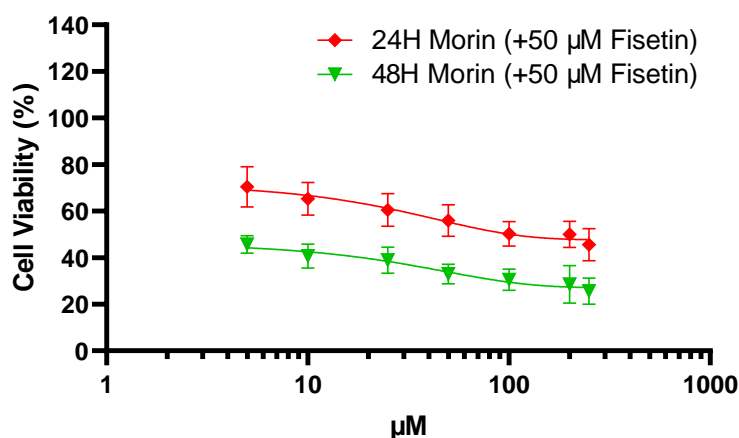


**Γράφημα 3.12:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της φισετίνης και της μορίνης ξεχωριστά, σε χρονικό διάστημα 48 ωρών.

Έπειτα, μελετήθηκε το δεύτερο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα φισετίνης και μορίνης, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν ταυτόχρονα, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μορίνης 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  και 250  $\mu\text{M}$ , και σε επιπλέον 50  $\mu\text{M}$  φισετίνης, ποσότητα η οποία προστέθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις μορίνης, για χρονικό διάστημα 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.



Όσον αφορά τα αποτελέσματα του δεύτερου δοσολογικού σχήματος μορίνης και επιπλέον 50  $\mu\text{M}$  φισετίνης, μετά το πέρας των 24 ωρών, παρατηρείται σημαντική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της κυτταροτοξικότητας όπου στις υψηλές συγκεντρώσεις του συνδυασμού των ουσιών 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων μειώνεται στο 45%. Αντίθετα στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών, παρατηρείται ιδιαίτερα ισχυρή δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα του μείγματος, καθώς ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 5  $\mu\text{M}$  - 25  $\mu\text{M}$ , παρατηρείται δραστική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 40%. Παράλληλα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , στις 48 ώρες, σημειώνεται ακόμα μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, που αποτελεί τη σημαντικότερη τοξική δράση των ουσιών έναντι των κυττάρων NIH, καθώς η τιμή της κυτταρικής βιωσιμότητας μειώνεται σε ποσοστό που φτάνει το 25%, σημειώνοντας το χαμηλότερο ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης των κυττάρων, συγκριτικά με όλα τα δοσολογικά σχήματα που μελετήθηκαν τα κύτταρα NIH/3T3 (Γράφημα 3.13).



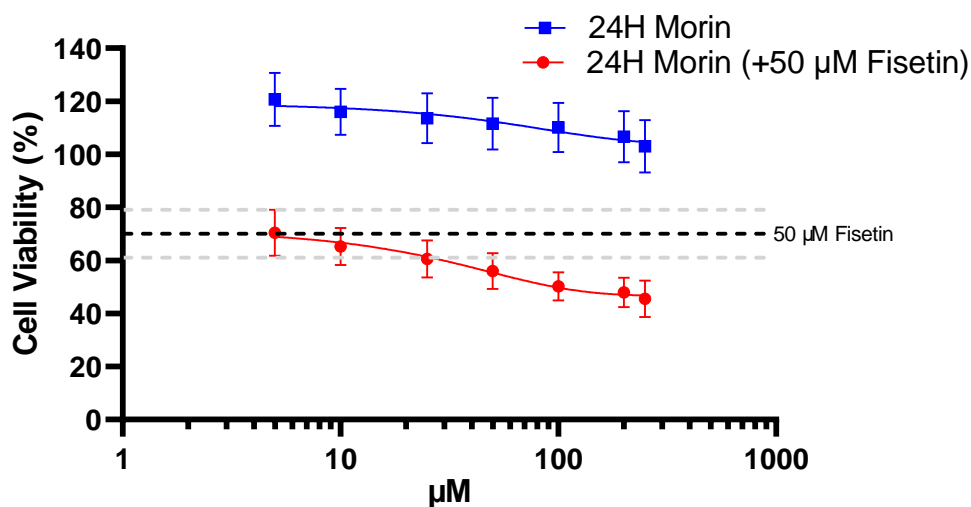
**Γράφημα 3.13:** Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης, για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας, τις δράσεις της φισετίνης, της μορίνης καθώς και του μείγματος ουσιών του δεύτερου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έναντι των κυττάρων NIH/3T3, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, εξάγεται το συμπέρασμα πως ο συνδυασμός της μορίνης με την επιπλέον ποσότητα φισετίνης, εμφανίζει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση, η οποία πιθανόν εξαρτάται από την ισχυρή δραστηριότητα της φισετίνης, η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, προκαλεί υψηλότερη κυτταρική θνησιμότητα.

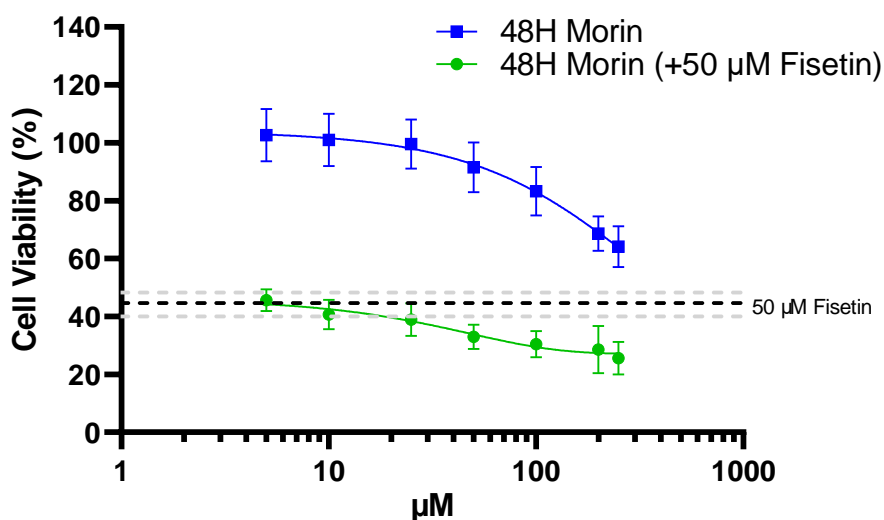
Όσον αφορά, της δράσης της φισετίνης και της μορίνης συγκριτικά με τα αποτελέσματα του μείγματος ουσιών του δεύτερου συνδυαστικού δοσολογικού σχήματος, έναντι των κυττάρων NIH/3T3, στις 24 ώρες, ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση εμφανίζει το μείγμα ουσιών με την

επιπλέον ποσότητα φισετίνης, όπου στις συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται κάτω από το 50%, ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις η φισετίνη μειώνει την κυτταρική επιβίωση στο 60%, και η μορίνη δεν επιφέρει κανένα κυτταροτοξικό αποτέλεσμα, αφού το ποσοστό της βιωσιμότητας ανέρχεται στο 100% (Γράφημα 3.14).

Αντιστοίχως στις 48 ώρες, στο μείγμα ουσιών με την επιπλέον ποσότητα φισετίνης, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 5  $\mu\text{M}$  - 25  $\mu\text{M}$ , παρατηρείται δραστική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 40%, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , παρουσιάζεται ιδιαίτερα μειωμένο ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας, το οποίο ανέρχεται περίπου στο 25%, σημειώνοντας το χαμηλότερο ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης των NIH/3T3. Αντίθετα, το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας της φισετίνης των 48 ωρών, στις ίδιες συγκεντρώσεις, δεν μειώνεται κάτω από το 40%, ενώ η μορίνη φαίνεται πως ασκεί ήπια δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , όπου το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης μειώνεται έως στο 60% (Γράφημα 3.15).



**Γράφημα 3.14:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης, συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της μορίνης, σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, +/- Τυπική Απόκλιση.



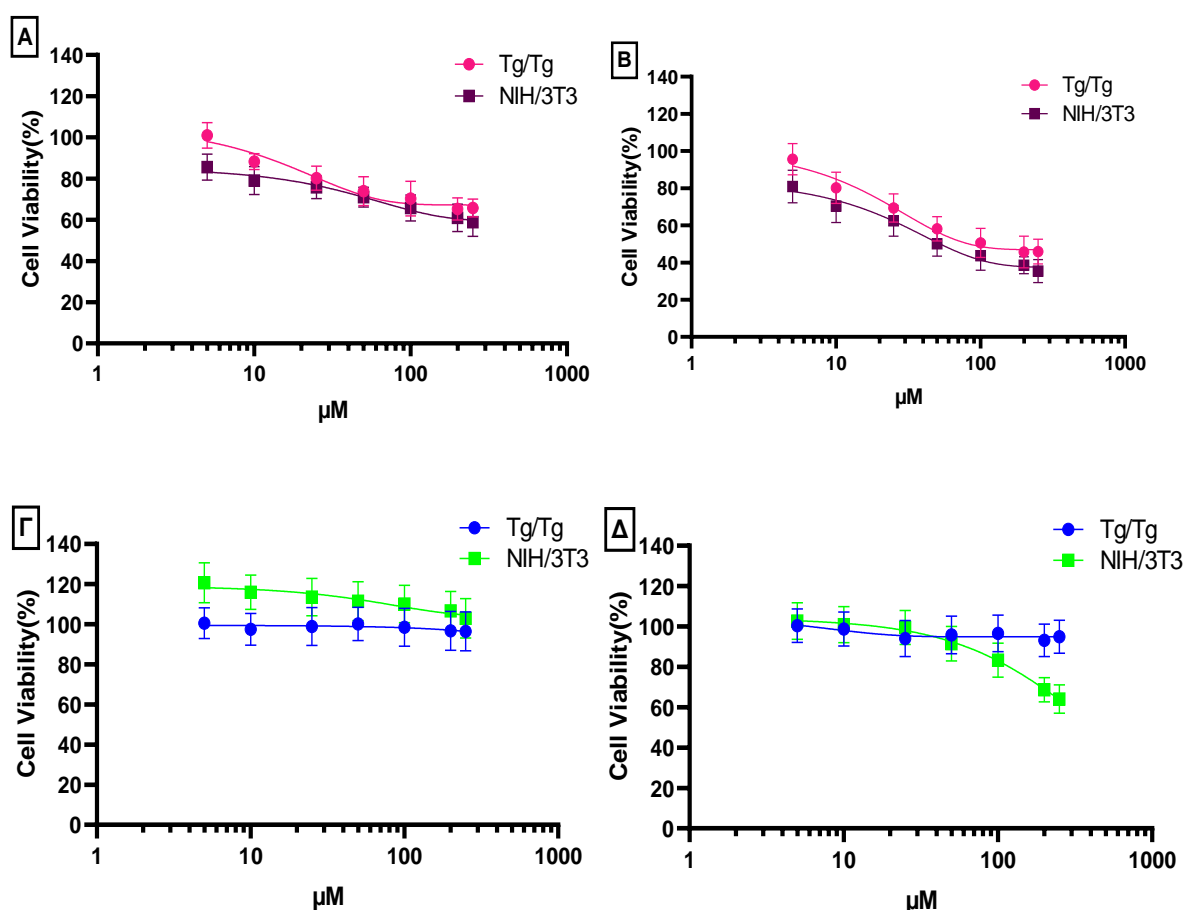
**Γράφημα 3.15:** Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, στη μορίνη και με επιπλέον 50μM φισετίνης, συγκριτικά με την κυτταρική βιωσιμότητα της μορίνης, σε χρονικό διάστημα 48 ωρών, +/- Τυπική Απόκλιση.

### 3.1.3 Σύγκριση Κυτταρικής Βιωσιμότητας στα κύτταρα Tg/Tg και NIH/3T3

Ακολουθεί σύγκριση των ποσοστών της κυτταρικής βιωσιμότητας, των κυτταρικών σειρών Tg/Tg και NIH/3T3, βάση των δοσολογικών σχημάτων φισετίνης και μορίνης, στα οποία εκτέθηκαν. Αρχικά, συγκρίνεται η κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3, έπειτα από την έκθεσή τους, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Συγκρίνοντας, τη δράση της φισετίνης με τη δράση της μορίνης, έναντι των κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3, στα χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, διακρίνονται εύκολα οι ισχυρότερες κυτταροτοξικές ιδιότητες της φισετίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές, έναντι της μορίνης, η οποία εμφανίζει κυτταροτοξικά αποτελέσματα μόνο στα κύτταρα NIH/3T3, και δεν επιφέρει καμία τοξική επίδραση στα Tg/Tg.

Όσον αφορά τη δράση της φισετίνης στα κύτταρα Tg/Tg και NIH/3T3 στις 24 ώρες, (Γράφημα 3.16.A), η τοξικότητα της φισετίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές, φαίνεται να είναι τόσο δόσοεξαρτώμενη όσο και χρονοεξαρτώμενη, όπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας (100 μM - 250 μM), παρουσιάζεται μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 70% - 60% και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, στις 48 ώρες και στις ίδιες συγκεντρώσεις, στα κύτταρα NIH/3T3, η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των Tg/Tg, και κυμαίνεται σε ποσοστό έως και χαμηλότερο του 40%, υποδεικνύοντας την ισχυρότερη χρονοεξαρτώμενη τοξική δράση της φισετίνης έναντι των κυττάρων NIH/3T3, σε σχέση με τα Tg/Tg (Γράφημα 3.16.B).

Όσον αφορά τη δράση της μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg και NIH/3T3 στις 24 ώρες, στο (Γράφημα 3.16.Γ), δεν παρουσιάζεται κάποια χρονοεξαρτώμενη ή δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα έναντι και των δύο κυτταρικών σειρών, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας δεν μειώθηκε κάτω από 90%. Αντίθετα στις 48 ώρες (Γράφημα 3.16.Δ), εμφανίζεται ήπια δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα της μορίνης στα κύτταρα NIH/3T3, όπου στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 200  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$ , η μείωση είναι σημαντική και κυμαίνεται σε ποσοστό περίπου 60%. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα Tg/Tg, μετά το πέρας των 48 ωρών, δεν εμφανίζουν κάποια χρονοεξαρτώμενη ή δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα έναντι της μορίνης, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας δεν μειώθηκε κάτω από 90%. Επομένως, στα κύτταρα NIH/3T3, φαίνεται να δρουν και τα δύο φλαβονοειδή, με την διαφορά βέβαια πως η φισετίνη διαθέτει πιο ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι της μορίνης, ενώ στα κύτταρα Tg/Tg, κυτταροτοξικές ιδιότητες εμφανίζει μόνο η φισετίνη.



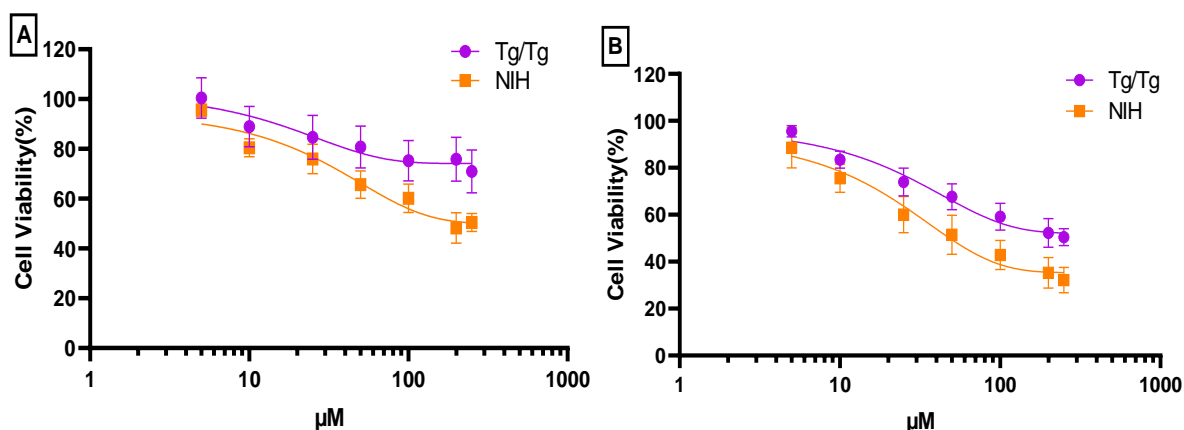
**Γράφημα 3.16:** (Α) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3 μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης για 24 ώρες, (Β) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3 μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φισετίνης για 48 ώρες, (Γ) Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3 μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίνης για 24 ώρες, (Δ)

*Κυτταρική βιωσιμότητα κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3 μετά την έκθεσή τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίνης για 48 ώρες.*

Στη συνέχεια, ακολουθεί σύγκριση των κυττάρων Tg/Tg και NIH/3T3, στο πρώτο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), για χρονική περίοδο 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πρώτου δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης (Γράφημα 3.17.A), μετά το πέρας των 24 ωρών, στα κύτταρα Tg/Tg, παρατηρείται χαμηλή δοσοεξαρτώμενη μεταβολή της τοξικότητας, καθώς μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις του συνδυασμού των ουσιών, το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων μειώνεται έως 70%. Αντίθετα στα κύτταρα NIH/3T3, παρουσιάζεται ισχυρότερη δοσοεξαρτώμενη μεταβολή της τοξικότητας, του μείγματος των ουσιών, όπου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις 100  $\mu$ M - 250  $\mu$ M, το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας κυμαίνεται στο 60% - 50% αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πρώτου δοσολογικού σχήματος, μετά το πέρας των 48 ωρών, στα κύτταρα Tg/Tg, εμφανίζεται δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα του μείγματος των ουσιών, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης είναι αμελητέα, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε ικανοποιητικό βαθμό, σε ποσοστό έως 50%, γεγονός που υποδηλώνει πως τα κυτταροτοξικότητα αποτελέσματα της φισετίνης στα κύτταρα Tg/Tg, είναι ευθέως ανάλογα με το χρονικό διάστημα έκθεσης των κυττάρων, στην ουσία αυτή. Αντίθετα στα κύτταρα NIH/3T3, εμφανίζεται ισχυρότερη δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα του μείγματος των ουσιών, όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις η μείωση της κυτταρικής επιβίωσης είναι αμελητέα, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις 50  $\mu$ M - 250  $\mu$ M, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε ικανοποιητικό βαθμό, σε ποσοστό από 50% έως χαμηλότερο του 30% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο Γράφημα 3.17.B και αποδεικνύουν πως τα κύτταρα NIH/3T3, είναι πιο ευάλωτα στην τοξική δράση των υπό μελέτη ουσιών, καθώς εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας συγκριτικά με αυτά των Tg/Tg, χαρακτηριστικό που πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη τοξικής δράσης και των δύο φλαβονοειδών έναντι των κυττάρων NIH/3T3 ή στην ύπαρξη της HSP70 στα κύτταρα Tg/Tg, η οποία διαθέτει κυτταροπροστατευτική δράση, μειώνοντας την ισχυρή τοξικότητα της φισετίνης και μπλοκάροντας την πιθανή τοξικότητα της μορίνης.

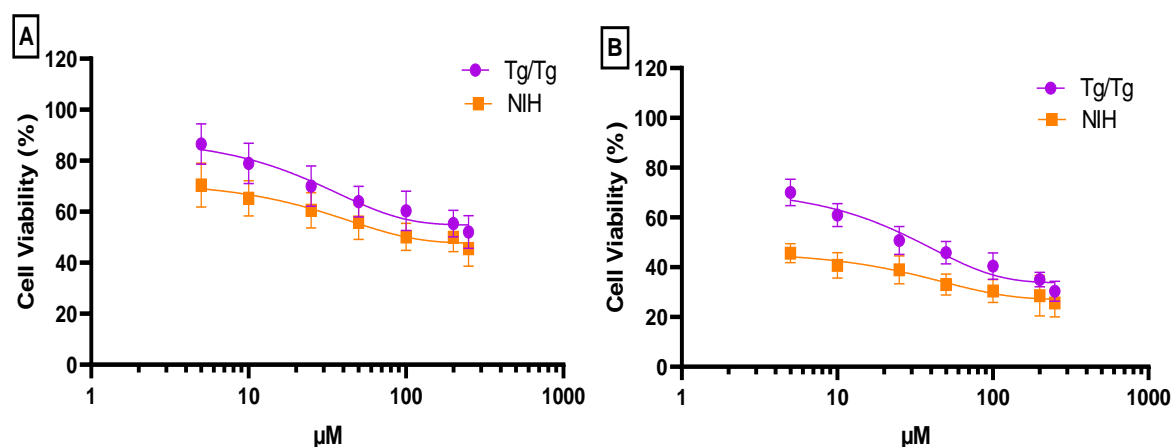


**Γράφημα 3.17:** (A) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg και NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), για χρονικό διάστημα 24 ωρών, (B) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg και NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους, και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, σε αναλογία φισετίνης και μορίνης (1:1), για χρονικό διάστημα 48 ωρών.

Έπειτα, συγκρίνοντας το δεύτερο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα φισετίνης και μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg και NIH/3T3, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν ταυτόχρονα, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μορίνης και σε επιπλέον 50 μM φισετίνης, για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών αντίστοιχα, μετά το πέρας των 24 ωρών, παρατηρείται ήπια δόσοεξαρτώμενη μεταβολή της κυτταροτοξικότητας με παραπλήσια μείωση της κυτταρικής επιβίωσης και στις δύο κυτταρικές σειρές, ιδιαίτερα στις υψηλές συγκεντρώσεις 100 μM - 250 μM, όπου το ποσοστό της επιβίωσης μειώνεται στο 50% (Γράφημα 3.18.A). Παρόλα αυτά, στα κύτταρα Tg/Tg στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των δύο ουσιών (5 μM - 25 μM), η κυτταρική βιωσιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό  $\geq 70\%$ , τιμή υψηλότερη συγκριτικά με τη κυτταρική βιωσιμότητα της IC<sub>50</sub> φισετίνης, η οποία ανέρχεται στο 70%. Αντίθετα, στα κύτταρα NIH/3T3 ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (5 μM - 25 μM), παρατηρείται σημαντική δόσοεξαρτώμενη αύξηση της κυτταροτοξικότητας καθώς το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης παραμένει μικρότερο του 50%, ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις του συνδυασμού των ουσιών 100 μM - 250 μM, η μείωση είναι σημαντικότερη αφού το ποσοστό της επιβίωσης των κυττάρων μειώνεται στο 45%.

Αντίθετα, στο χρονικό διάστημα των 48 ωρών, παρατηρείται ισχυρή δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη τοξικότητα, όπου στα κύτταρα NIH/3T3, ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 5 μM - 25 μM, παρατηρείται δραστική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 40%, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 200 μM - 250 μM, σημειώνεται ακόμα μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση, που αποτελεί τη σημαντικότερη τοξική δράση των ουσιών έναντι των κυττάρων NIH, καθώς η τιμή της κυτταρικής βιωσιμότητας μειώνεται

σε ποσοστό που φτάνει το 25% (Γράφημα 3.18.B). Αντίθετα στα κύτταρα Tg/Tg, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των δύο ουσιών (5  $\mu\text{M}$  - 25  $\mu\text{M}$ ), η κυτταρική βιωσιμότητα ανέρχεται σε ποσοστό  $\geq 50\%$ , τιμή υψηλότερη συγκριτικά με τη κυτταρική βιωσιμότητα της IC<sub>50</sub> φισετίνης, η οποία ανέρχεται στο 50%. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις από 100  $\mu\text{M}$  έως 250  $\mu\text{M}$ , το μείγμα ουσιών με την επιπλέον ποσότητα φισετίνης, παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας, το οποίο ανέρχεται περίπου στο 30%. Επιπλέον, η μορίνη όπως ήδη έχει αναφερθεί στις 48 ώρες, δεν εμφανίζει καμία δόσοεξαρτώμενη ή χρονοεξαρτώμενη τοξική δράση, καθώς το ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης δεν μειώνεται κάτω από το 90%. Επομένως, τα παραπάνω αποδεικνύουν την ισχυρή χρονοεξαρτώμενη δράση της φισετίνης, και στις δύο κυτταρικές σειρές, με πιο ευαίσθητα τα κύτταρα NIH/3T3, καθώς εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας.



**Γράφημα 3.18:** (A) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg και NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης για 24 ώρες, (B) Σύγκριση κυτταρικής βιωσιμότητας κυττάρων Tg/Tg και NIH μετά την ταυτόχρονη έκθεσή τους στη μορίνη και με επιπλέον 50 $\mu\text{M}$  φισετίνης για 48 ώρες.

### 3.2 Έλεγχος Ικανότητας Σχηματισμού Αποικιών (Clonogenic Assay)

Πραγματοποιήθηκε δόσοεξαρτώμενη διερεύνηση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυτταρικών σειρών Tg/Tg και NIH/3T3, έπειτα από τη μεμονωμένη έκθεσή τους, στη φισετίνη και τη μορίνη, σε συγκεντρώσεις 10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$  για 24 ώρες. Παράλληλα, οι δύο ουσίες μελετήθηκαν και σε συνδυαστικά δοσολογικά σχήματα, με σκοπό να διερευνηθεί πιθανή συνεργιστική ή

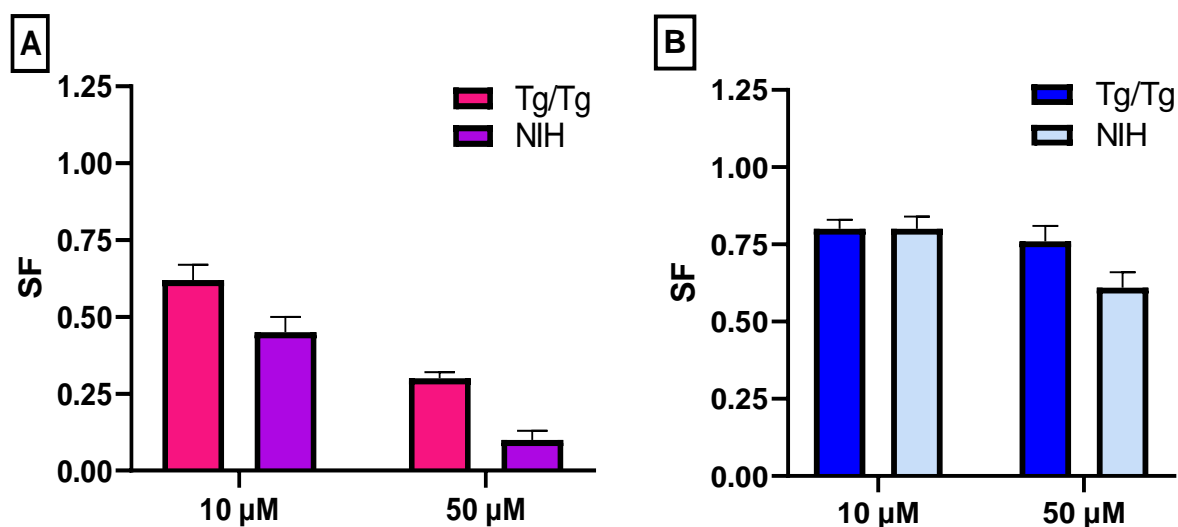
ανταγωνιστική δράση, των δύο αυτών φλαβονοειδών. Στο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, με τις συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας να κυμαίνονται ως εξής: 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ . Το χρονικό διάστημα της επώασης των κυττάρων με τα φλαβονοειδή είναι οι 24 ώρες.

Σε συγκεντρώσεις φισετίνης 10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$  τα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3 αδυνατούν να σχηματίσουν αποικίες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 45% για τη συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ , ενώ σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  το αποτέλεσμα είναι ανάλογο της τοξικότητας, με το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων να μην ξεπερνά το 10%, Εικόνα 3.1 και Γράφημα 3.19. Παρόλο που σε συγκέντρωση φισετίνης 50  $\mu\text{M}$  παρατηρήθηκε κυτταρική επιβίωση στη μέθοδο (MTT), στη δοκιμασία ελέγχου ικανότητας σχηματισμού αποικιών, τα κύτταρα αδυνατούν να δημιουργήσουν ικανοποιητικό αριθμό αποικιών, επιβεβαιώνοντας την τοξική δράση της φισετίνης. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα πως οι κυτταρικές βλάβες που επιφέρει η φισετίνη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και κυρίως στη συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ , είναι μόνιμες και μη αναστρέψιμες.

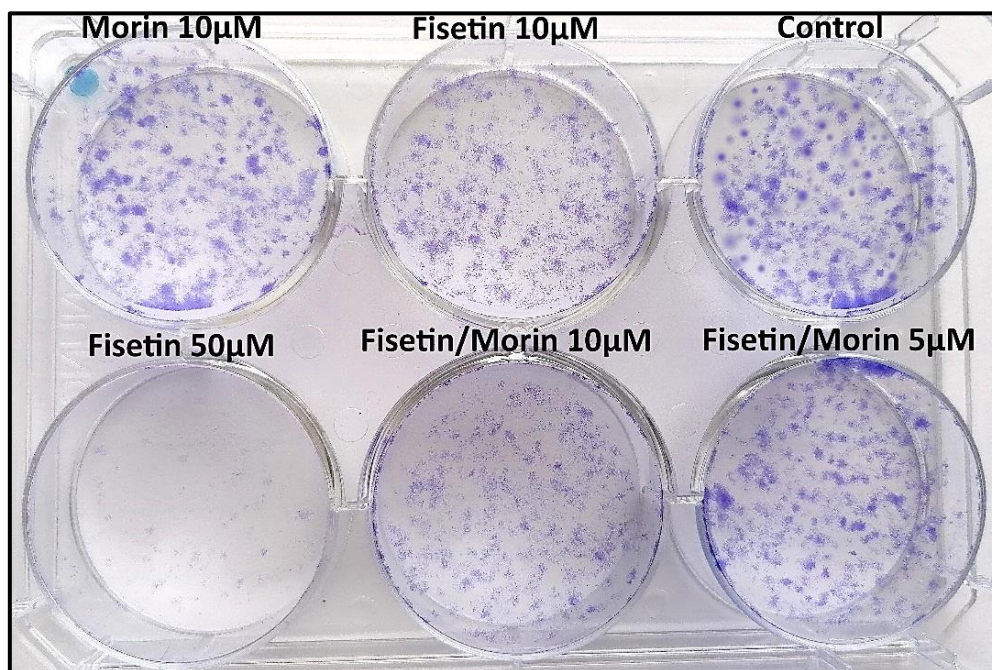
Αντίθετα η μορίνη σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ , φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στα κύτταρα, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό τους ανέρχεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, ενώ σε συγκέντρωση (50  $\mu\text{M}$ ) η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται ελαφρώς, εμφανίζοντας ήπια αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό μειώνεται σε ποσοστό 60% (Εικόνα 3.3.A).

Όσον αφορά τα κύτταρα Tg/Tg, σε συγκεντρώσεις φισετίνης 10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$  φαίνεται να αδυνατούν να σχηματίσουν αποικίες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% για τη συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ , ενώ σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  το αποτέλεσμα είναι ανάλογο της τοξικότητας, με το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων να μην ξεπερνά το 30% (Εικόνα 3.2). Αντίθετα η μορίνη και στις δύο συγκεντρώσεις 10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ , φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στα κύτταρα, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων παρέμεινε σχεδόν σταθερό και αμετάβλητο σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, σε ποσοστό 80%.

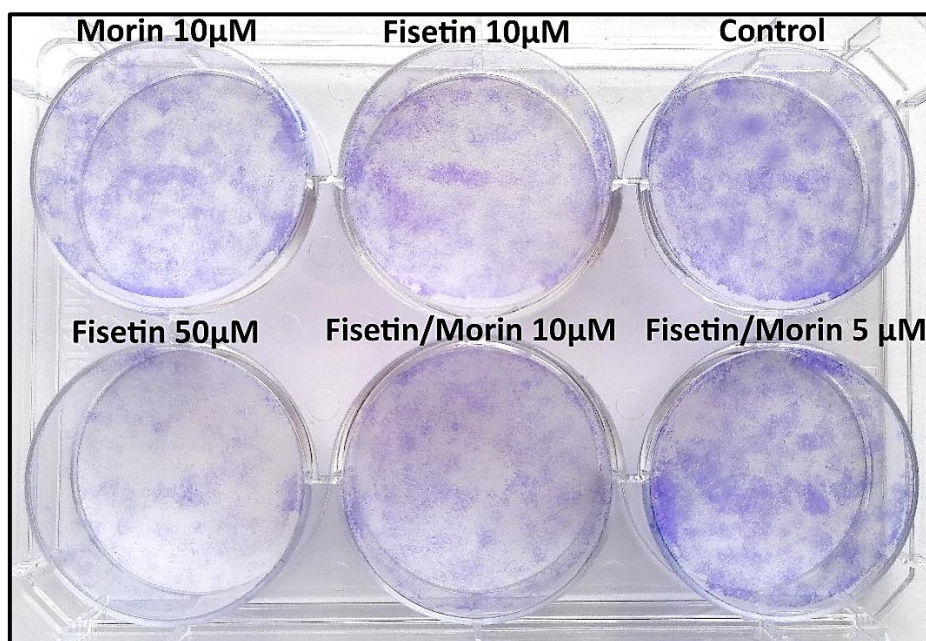




**Γράφημα 3.19:** (A) Γραφική απεικόνιση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων NIH/3T3 και TgTg, έπειτα από έκθεση σε διαφορετικές δύο συγκεντρώσεις φισετίνης (10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες, (B) Γραφική απεικόνιση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων NIH/3T3 και TgTg, έπειτα από έκθεση σε διαφορετικές δύο συγκεντρώσεις μορίνης (10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ ) για 24 ώρες.



**Εικόνα 3.1:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα NIH/3T3, μετά την έκθεσή τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, καθώς και του συνδυασμού τους για 24 ώρες. Στη συγκέντρωση φισετίνης (50  $\mu\text{M}$ ), οπτικά καθίστανται εύκολα αντιληπτά τα τοξικά αποτελέσματα της φισετίνης, στη δημιουργία αποικιών, καθώς συγκριτικά με δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί κάποια ουσία (Control), ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών είναι σημαντικά μικρότερος.



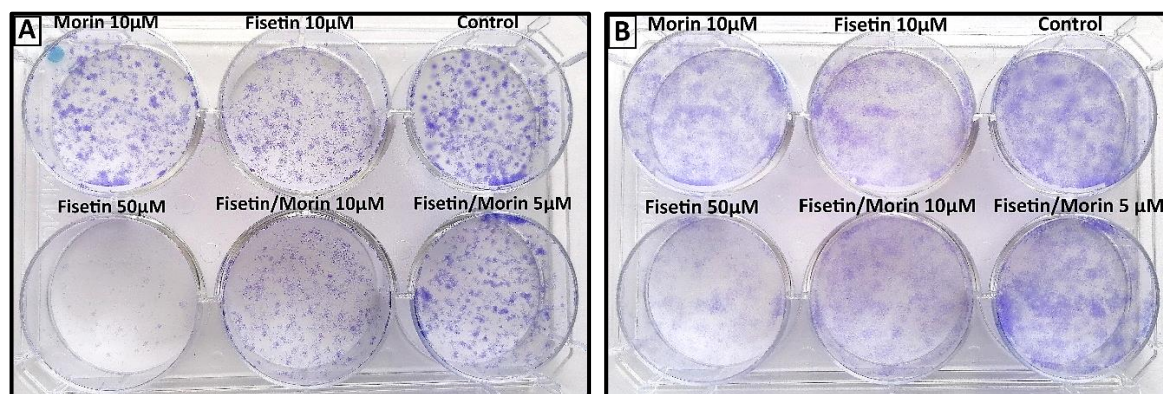
**Εικόνα 3.2:** Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα Tg/Tg, μετά την έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, καθώς και του συνδυασμού τους για 24 ώρες. Στη συγκέντρωση φισετίνης (50 µM), οπτικά καθίστανται εύκολα αντιληπτά τα τοξικά αποτελέσματα της φισετίνης, στη δημιουργία αποικιών, καθώς συγκριτικά με δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί κάποια ουσία (Control), ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών είναι σημαντικά μικρότερος.

Συγκρίνοντας, τη δράση της φισετίνης με τη δράση της μορίνης, έναντι των κυττάρων NIH/3T3 και Tg/Tg, στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών, και στις συγκεντρώσεις 10 µM και 50 µM, διακρίνονται εύκολα οι τοξικές ιδιότητες της φισετίνης και στα δύο είδη κυττάρων, σε αντίθεση με τη μορίνη, η οποία εμφανίζει μεταβολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών μόνο στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3.

Όσον αφορά τα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3, σε συγκεντρώσεις φισετίνης 10 µM τα κύτταρα φαίνεται να αδυνατούν να σχηματίσουν αποικίες σε ποσοστό μεγαλύτερο του (45%), ενώ σε συγκέντρωση 50 µM το αποτέλεσμα είναι ανάλογο της τοξικότητας, με το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων να μην ξεπερνά το 10%. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα πως οι κυτταρικές βλάβες που επιφέρει η φισετίνη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και κυρίως στη συγκέντρωση 50 µM, είναι μόνιμες και μη αναστρέψιμες. Αντίθετα η μορίνη σε συγκέντρωση 10 µM, φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στα κύτταρα, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό τους ανέρχεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, ενώ σε συγκέντρωση 50 µM η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται

να επηρεάζεται ελαφρώς, εμφανίζοντας ήπια αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό μειώνεται σε ποσοστό 60%.

Όσον αφορά τα κύτταρα Tg/Tg, φαίνεται να αδυνατούν να σχηματίσουν αποικίες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% για τη συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$ , ενώ σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  το αποτέλεσμα είναι ανάλογο της τοξικότητας, με το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων να μην ξεπερνά το 30%. Αντίθετα η μορίνη και στις δύο συγκεντρώσεις 10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ , φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στα κύτταρα, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων παρέμεινε σχεδόν σταθερό και αμετάβλητο σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, σε ποσοστό 80%. Επομένως, η φισετίνη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα σχηματισμού αποικιών και των δύο κυτταρικών σειρών, με τα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3 να είναι λιγότερο ανθεκτικά συγκριτικά με τα Tg/Tg. Στην υψηλότερη συγκέντρωση φισετίνης 50  $\mu\text{M}$ , τα ποσοστά ικανότητας σχηματισμού αποικιών μειώνονται στο 10% και 30% αντίστοιχα στα NIH/3T3 και Tg/Tg κύτταρα. Τέλος, όπως αναφέρεται και παραπάνω η μορίνη, εμφανίζει ήπια μεταβολή στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών μόνο στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3, σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ , όπου το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων μειώνεται σε ποσοστό 60%. Αντίθετα, στα Tg/Tg η μορίνη και στις δύο συγκεντρώσεις (10  $\mu\text{M}$  και 50  $\mu\text{M}$ ), φαίνεται να μην επιδρά σημαντικά στα κύτταρα, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων παρέμεινε σχεδόν σταθερό και αμετάβλητο σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, σε ποσοστό 80%. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3 και το Γράφημα 3.19.



**Εικόνα 3.3:** (A) Συγκριτική απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα NIH/3T3, μετά την έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, καθώς και του συνδυασμού των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες, (B) Συγκριτική απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα Tg/Tg, μετά την έκθεση τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φισετίνης και μορίνης, καθώς και του συνδυασμού των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες. Και στις δύο κυτταρικές σειρές, στη συγκέντρωση φισετίνης (50  $\mu\text{M}$ ), οπτικά καθίστανται εύκολα αντιληπτά τα τοξικά αποτελέσματα της φισετίνης, στη δημιουργία αποικιών, καθώς συγκριτικά με δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί κάποια ουσία (Control), ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών είναι σημαντικά μικρότερος.

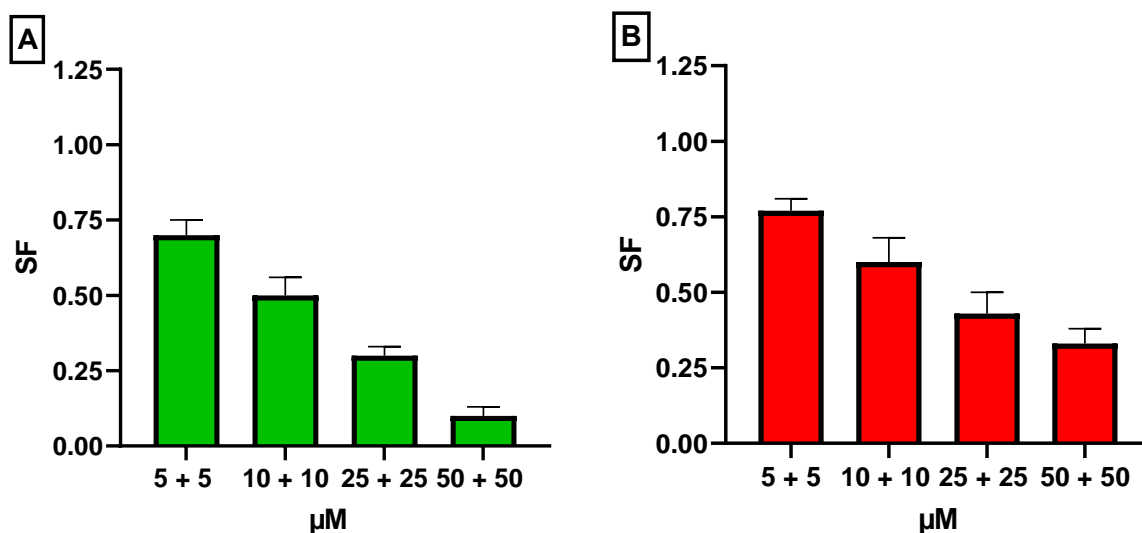
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δοσοεξαρτώμενη διερεύνηση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων NIH/3T3 και Tg/Tg, σε συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα των δύο φλαβονοειδών, με ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων και στις δύο ουσίες, σε ισόποσες συγκεντρώσεις, με τις συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας να κυμαίνονται ως εξής: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M και 50  $\mu$ M. Το χρονικό διάστημα της επώασης των κυττάρων με τα φλαβονοειδή είναι οι 24 ώρες.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 5  $\mu$ M - 10  $\mu$ M, η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται ελαφρώς, αλλά δεν παρουσιάζεται σημαντική μείωση του κλωνογόνου δυναμικού των κυττάρων, καθώς τα κύτταρα φαίνεται να σχηματίζουν αποικίες σε ποσοστά 70% - 50% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 25  $\mu$ M - 50  $\mu$ M, παρατηρείται ιδιαίτερα σημαντική μείωση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων, τόσο σε συγκέντρωση 25  $\mu$ M όσο και σε 50  $\mu$ M, καθώς η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται δραστικά από τα φλαβονοειδή. Ειδικότερα, το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων στη συγκέντρωση 25  $\mu$ M του μείγματος των ουσιών, ανέρχεται σε ποσοστό 30%, ενώ στη συγκέντρωση 50  $\mu$ M, η μείωση είναι δραστικότερη σε ποσοστό 10%. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της φισετίνης ενδεχομένως προκαλούν μη αναστρέψιμες κυτταρικές βλάβες, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών μηχανισμών των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4.A και στο Γράφημα 3.20.A.

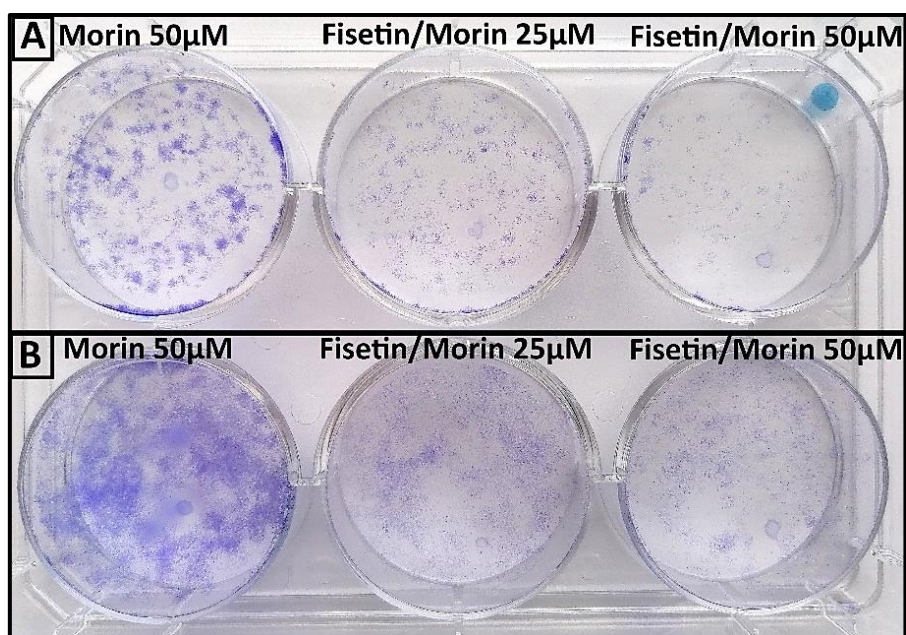
Όσον αφορά τα αποτελέσματα του δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 5  $\mu$ M - 10  $\mu$ M, η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών δεν επηρεάζεται σημαντικά, καθώς τα κύτταρα φαίνεται να σχηματίζουν κανονικά αποικίες, με το κλωνογόνο δυναμικό να είναι μεγαλύτερο του 70%. Αντίθετα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 25  $\mu$ M - 50  $\mu$ M, παρατηρείται μείωση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων, καθώς η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται από τη φισετίνη. Ειδικότερα, το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων στη συγκέντρωση 25  $\mu$ M του μείγματος των ουσιών, ανέρχεται σε ποσοστό 40%, ενώ στη συγκέντρωση 50  $\mu$ M, η μείωση είναι δραστικότερη σε ποσοστό 30%. Επομένως, η ικανότητα των κυττάρων Tg/Tg, να δημιουργούν αποικίες δεν μηδενίζεται αλλά μειώθηκε κατά 70%, γεγονός που υποδεικνύει τη δραστικότητα της φισετίνης έναντι των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4.B και στο Γράφημα 3.20.B.

Συγκρίνοντας, την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων NIH/3T3 και Tg/Tg, στα συνδυαστικά δοσολογικά σχήματα των δύο φλαβονοειδών, όσον αφορά τα αποτελέσματα του δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 5  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ , η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται ελαφρώς, αλλά δεν παρουσιάζεται σημαντική μείωση του κλωνογόνου δυναμικού των κυττάρων, καθώς τα κύτταρα φαίνεται να σχηματίζουν αποικίες σε ποσοστά 70% - 50% στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 25  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ , παρατηρείται ιδιαίτερα σημαντική μείωση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων, τόσο σε συγκέντρωση 25  $\mu\text{M}$  όσο και σε 50  $\mu\text{M}$ , καθώς η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται δραστικά από τα φλαβονοειδή. Ειδικότερα, το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων στη συγκέντρωση 25  $\mu\text{M}$  του μείγματος των ουσιών, ανέρχεται σε ποσοστό 30%, ενώ στη συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ , η μείωση είναι δραστικότερη σε ποσοστό μόλις 10%. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα πως η κατακόρυφη μείωση του κλάσματος επιβίωσης των φυσιολογικών κυττάρων πιθανόν οφείλεται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της φισετίνης, η οποία ενδεχομένως προκαλεί μη αναστρέψιμες κυτταρικές βλάβες, γεγονός που προκαλείται από την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών μηχανισμών των κυττάρων.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του δοσολογικού σχήματος, φισετίνης και μορίνης στα κύτταρα Tg/Tg, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών 5  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ , η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών δεν επηρεάζεται σημαντικά, καθώς τα κύτταρα φαίνεται να σχηματίζουν κανονικά αποικίες, με το κλωνογόνο δυναμικό να είναι μεγαλύτερο του 70%. Ειδικότερα, η υψηλότερη επιβίωση των κυττάρων Tg/Tg στην κλωνογόνο δοκιμασία, υποδεικνύει πως είτε τα κύτταρα είναι ικανά είτε να επιδιορθώσουν βλάβες που προκλήθηκαν από τη φισετίνη, είτε δεν ενεργοποιήθηκαν τα προαποπτωτικά μονοπάτια σηματοδότησης. Αντίθετα, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μείγματος των ουσιών (25  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ ), παρατηρείται μείωση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων, καθώς η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται από τη φισετίνη. Ειδικότερα, το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων στη συγκέντρωση 25  $\mu\text{M}$  του μείγματος των ουσιών, ανέρχεται σε ποσοστό 40%, ενώ στη συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$ , η μείωση είναι δραστικότερη σε ποσοστό 30%. Επομένως, η ικανότητα των κυττάρων Tg/Tg, να δημιουργούν αποικίες δεν μηδενίζεται αλλά μειώθηκε κατά 70%, γεγονός που υποδεικνύει τη δραστηριότητα της φισετίνης έναντι των κυττάρων. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4.B και το Γράφημα 3.20.B.



**Γράφημα 3.20:** (A) Γραφική απεικόνιση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων NIH/3T3, έπειτα από έκθεση σε συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες, (B) Γραφική απεικόνιση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων TgTg, έπειτα από έκθεση σε συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες.



**Εικόνα 3.4:** (A) Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα NIH/3T3, μετά την έκθεσή τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μορίνης, καθώς και του συνδυασμού των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες, (B) Απεικόνιση των τρυβλίων, όπου διακρίνονται οι αποικίες των κυττάρων που σχηματίστηκαν σε χρονικό διάστημα 10 ημερών, από τα κύτταρα Tg/Tg, μετά την έκθεσή τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις μορίνης, καθώς και του συνδυασμού των δύο φλαβονοειδών για 24 ώρες. Στη συγκέντρωση μορίνης (50 μM), οπτικά φαίνεται να μειώνεται ελαφρώς μόνο η κλωνογονική ικανότητα των κυττάρων NIH/3T3, καθώς συγκριτικά με δείγμα στο

*οποίο δεν έχει προστεθεί κάποια ουσία (Control) στην (Εικόνα 3.1), ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών είναι μικρότερος.*

Συμπερασματικά, στην κλωνογονική δοκιμασία των δύο κυτταρικών σειρών, η φισετίνη φαίνεται να ασκεί τοξική δράση και στα δύο είδη κυττάρων, καθώς στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα κύτταρα αδυνατούν να σχηματίσουν ικανοποιητικό αριθμό αποικιών, μειώνοντας σημαντικά το κλωνογόνο δυναμικό τους. Στην κυτταροτοξική αυτή δοκιμασία σχηματισμού αποικιών, τα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3 αποδείχθηκαν πιο ευαίσθητα συγκριτικά με τα εμβρυικά κύτταρα μύος που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70, δηλαδή τα Tg/Tg, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην κυτταροπροστατευτική δράση στις HSP70. Συνεπώς, τα κύτταρα Tg/Tg φαίνεται να είναι ανθεκτικότερα στην τοξική δράση της φισετίνης, καθώς έπειτα από την επώασή τους με την ουσία, σχηματίζουν ικανοποιητικότερα αποικίες, συγκριτικά με τα κύτταρα NIH/3T3. Επομένως, οποιαδήποτε πιθανότητα συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής δράσης, των δύο φλαβονοειδών που μελετήθηκαν, απαιτεί περαιτέρω μελέτη και στις δύο κυτταρικές σειρές.

### 3.3 Κυτταρομετρία Ροής (KP)

#### 3.1 Προσδιορισμός Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) με KP

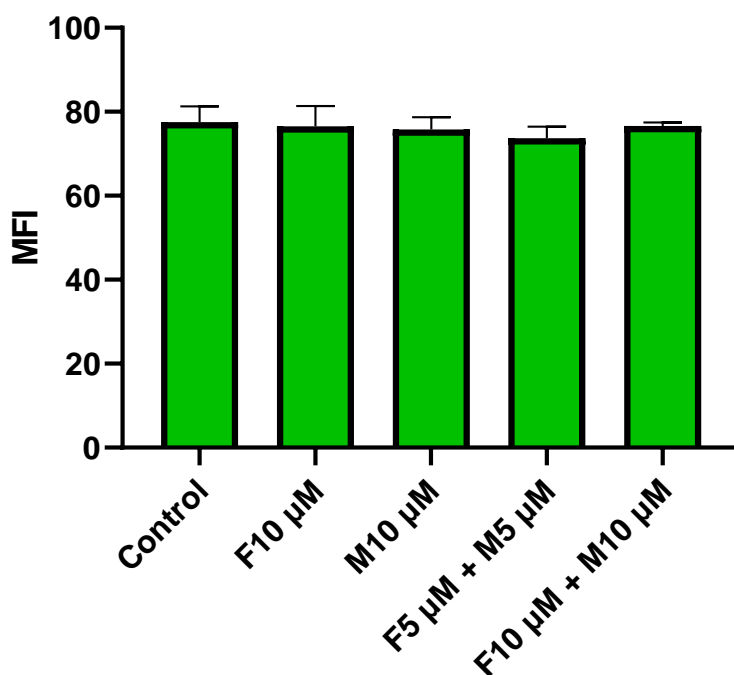
Οι ΔΜΟ, όπως ήδη έχει αναφερθεί και παραπάνω, αποτελούν φυσικά παραπροϊόντα της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας, που συμμετέχουν σε διάφορα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Παρόλα αυτά, σε υψηλές συγκεντρώσεις ευθύνονται για σοβαρά δομικά και λειτουργικά προβλήματα στα κύτταρα, προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Ο προσδιορισμός της ενδοκυττάριας παραγωγής των ΔΜΟ, πραγματοποιείται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Αρχικά, διερευνήθηκε η παραγωγή των ΔΜΟ μετά από την 24ωρη έκθεση των φυσιολογικών κυττάρων NIH/3T3 και Tg/Tg, στα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, σε μεμονωμένη έκθεση του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά, αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών. Κατά τη μεμονωμένη έκθεση των κυττάρων, η συγκέντρωση της φισετίνης και της μορίνης ήταν 10  $\mu\text{M}$ , ενώ κατά τον συνδυασμό, οι συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας ήταν 5  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$ .

Όσον αφορά τα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3, ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων των δύο φλαβονοειδών, δηλαδή της φισετίνης και της μορίνης, δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην παραγωγή των ΔΜΟ από τα κύτταρα. Στο Γράφημα 3.21 απεικονίζονται τα ποσοστά παραγωγής ΔΜΟ μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων NIH/3T3, με τα δύο υπό μελέτη

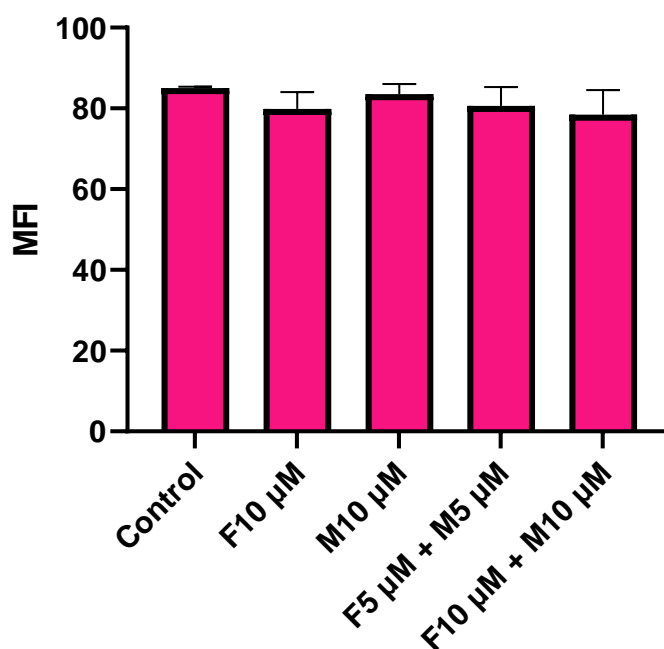
φλαβονοειδή σε συγκεντρώσεις 5  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$ , σε μεμονωμένη έκθεση του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών.

Όσον αφορά τα κύτταρα Tg/Tg, το αποτέλεσμα της διερεύνησης της ΔΜΟ είναι ανάλογο με αυτό των κυττάρων NIH/3T3, καθώς ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων της φισετίνης και της μορίνης, δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη παραγωγή των ΔΜΟ από τα κύτταρα. Στο Γράφημα 3.22 απεικονίζονται τα ποσοστά παραγωγής ΔΜΟ μετά από 24ώρες επώασης των κυττάρων Tg/Tg, με τα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή σε συγκεντρώσεις 5  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$ , σε μεμονωμένη έκθεση του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών. Επομένως, τόσο η φισετίνη όσο και η μορίνη, δεν επάγουν την παραγωγή των ΔΜΟ, γεγονός που τις καθιστά αβλαβείς για τα κύτταρα.



**Γράφημα 3.21:** Γραφική απεικόνιση μέσης έντασης φθορισμού των κυττάρων NIH/3T3, έπειτα από έκθεση σε φισετίνη και μορίνη σε συγκεντρώσεις (5  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ ), μεμονωμένα του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά, αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών, για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Ανεξαρτήτως συγκέντρωσης των φλαβονοειδών, δεν παρατηρείται κάποια τοξικότητα.





**Γράφημα 3.22:** Γραφική απεικόνιση μέσης έντασης φθορισμού των κυττάρων Tg/Tg, έπειτα από έκθεση σε φισετίνη και μορίνη σε συγκεντρώσεις (5  $\mu$ M - 10  $\mu$ M), μεμονωμένα του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά, αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών, για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Ανεξαρτήτως συγκέντρωσης των φλαβονοειδών, δεν παρατηρείται κάποια τοξικότητα.

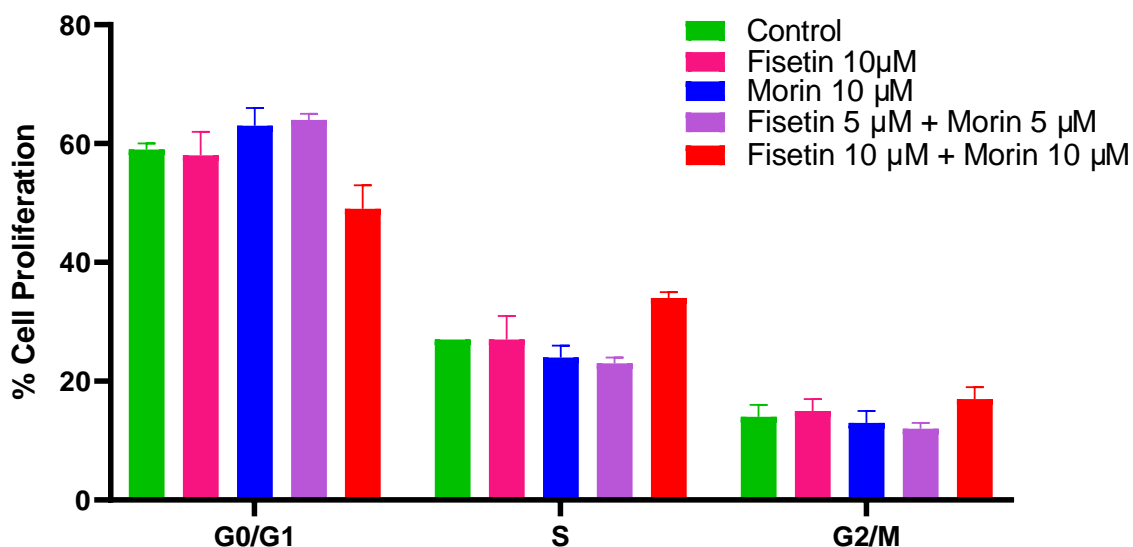
### 3.2 Κυτταρικός Κύκλος

Κατά τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου, διερευνήθηκε η επίδραση κάθε υπό μελέτη φλαβονοειδούς, στις δύο κυτταρικές σειρές NIH/3T3 και Tg/Tg, μέσω του προσδιορισμού της κατανομής των κυττάρων στη φάση G0/G1 έναντι της φάσης S, και G2/M. Η ποσοτική μέτρηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυτταρόμετρου. Η διερεύνηση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε μετά από την 24ωρη έκθεση των κυττάρων NIH/3T3 και Tg/Tg, στα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, σε μεμονωμένη έκθεση του κάθε φλαβονοειδούς ξεχωριστά, αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών. Κατά τη μεμονωμένη έκθεση των κυττάρων, η συγκέντρωση της φισετίνης και της μορίνης ήταν 10  $\mu$ M, ενώ κατά τον συνδυασμό, οι συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας ήταν 5  $\mu$ M και 10  $\mu$ M.

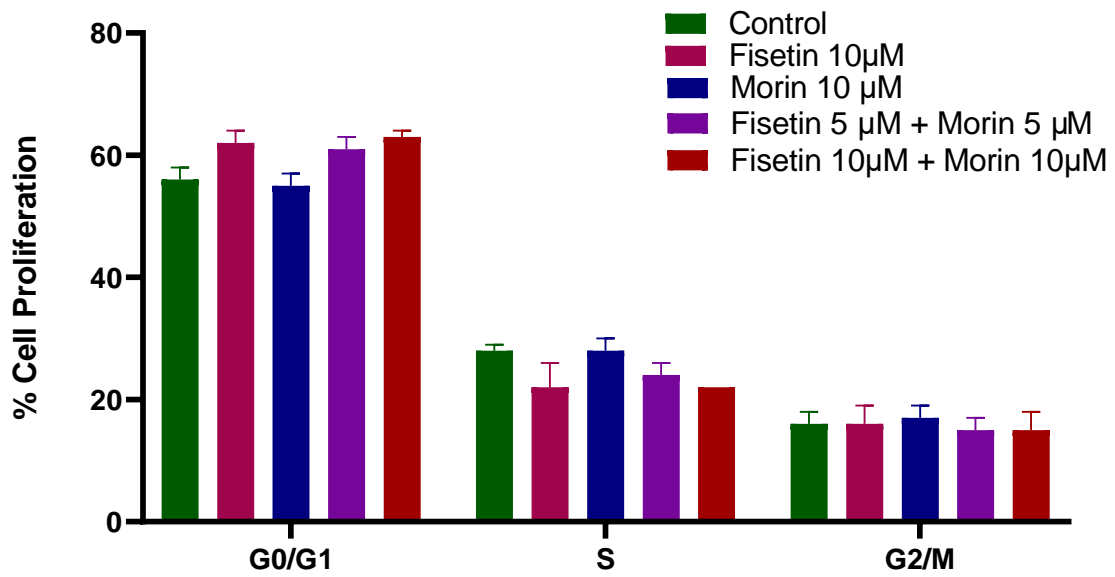
Όσον αφορά τις μεταβολές του κυτταρικού κύκλου στην κυτταρική σειρά NIH/3T3, μετά από επώαση για 24 ώρες, με φισετίνη και μορίνη αλλά και με συνδυασμό των δύο ουσιών, συγκριτικά με το Control, στο συνδυαστικό σχήμα των δύο φλαβονοειδών με συγκέντρωση 10  $\mu$ M για κάθε ουσία, παρατηρείται μία αύξηση του ποσοστού των κυττάρων στη φάση (S) του κυτταρικού,

ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (π.χ. εάν αυξάνεται σε μεγαλύτερες δόσεις). Επιπλέον, και τα αποτελέσματα της μεμονωμένης έκθεσης των κυττάρων στο εκάστοτε φλαβονοειδές καθώς και του συνδυαστικού σχήματος των δύο φλαβονοειδών με συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$  για κάθε ουσία, δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο Γράφημα 3.23.

Όσον αφορά τις μεταβολές του κυτταρικού κύκλου στην κυτταρική σειρά Tg/Tg, μετά από επώαση για 24 ώρες, με φισετίνη και μορίνη αλλά και με συνδυασμό των δύο ουσιών, συγκριτικά με το Control, η φισετίνη σε συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  καθώς και το μείγμα των δύο φλαβονοειδών σε συγκεντρώσεις 5  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$ , φαίνεται να επηρεάζουν τη φάση G0/G1 καθώς το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκεται στη συγκεκριμένη φάση αυξήθηκε, αλλά παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα είναι μη στατιστικά σημαντικά, καθώς τα δείγματα με τα υπό μελέτη φλαβονοειδή παρουσίασαν σχεδόν αντίστοιχη εικόνα με αυτή του Control. Επιπλέον σε συγκέντρωση μορίνης 10  $\mu\text{M}$  δεν παρατηρείται καμία μεταβολή σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς τα αποτελέσματα της ποσοτικής μέτρησης παρουσίασαν και σε αυτή την περίπτωση, σχεδόν πανομοιότυπη εικόνα με αυτή του Control.



**Γράφημα 3.23:** Ποσοστιαία ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων NIH/3T3 έπειτα από έκθεση σε φισετίνη και μορίνη μεμονωμένα σε συγκεντρώσεις (10  $\mu\text{M}$ ), αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών σε συγκεντρώσεις (5  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ ), για χρονικό διάστημα 24 ωρών.



**Γράφημα 3.24:** Ποσοστιαία ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων Tg/Tg έπειτα από έκθεση σε φισετίνη και μορίνη μεμονωμένα σε συγκεντρώσεις (10 µM), αλλά και σε ταυτόχρονη έκθεση με συνδυασμό των δύο ουσιών σε συγκεντρώσεις (5 µM - 10 µM), για χρονικό διάστημα 24 ωρών.

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η HSP70, αποτελεί μέλος της οικογένειας των μοριακών συνοδών (HSPs), το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς από την επιστημονική κοινότητα. Πρόκειται για πρωτεΐνη πανταχού παρούσα σε όλους τους οργανισμούς, τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς, η οποία επάγεται φυσιολογικά στα κύτταρα αλλά κυρίως έπειτα από την έκθεσή τους, σε ερεθίσματα κυτταρικού στρες (Sharma & Masison, 2009). Παράγοντες που επάγουν την παραγωγή της HSP70, αποτελούν διάφορα στρεσογόνα κυτταρικά ερεθίσματα όπως η υψηλή θερμοκρασία, η υποξία, το οξειδωτικό στρες, οι διαταραχές του pH καθώς και η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (Murphy, 2013). Σε μοριακό επίπεδο, η HSP70 δρα στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, στην αποικοδόμηση καθώς και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του μονόκλωνου DNA. Σε κυτταρικό επίπεδο, σχετίζεται με την κυτταρική βιωσιμότητα καθώς και με αποπτωτικούς μηχανισμούς, αναστέλλοντας διάφορα αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, διασφαλίζοντας την αύξηση της επιβίωσης των κυττάρων. Παράλληλα, προσδίδει θερμοανθεκτικότητα στα κύτταρα, προστατεύοντας αυτά, από βλαπτικές θερμοκρασίες, διαθέτοντας γενικότερη κυτταροπροστατευτική δράση (Angelidis et al., 1991). Τέλος, σε επίπεδο οργανισμού, συνδέεται με διάφορες ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Kasioumi et al., 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία της HSP70, είναι η νόσος Alzheimer (AD: Alzheimer Disease), η νόσος του Πάρκινσον (PD: Parkinson's Disease) και η Νόσος του Huntington (HD: Huntington's Disease) (Hu et al.,2022).

Όσον αφορά τον καρκίνο, η υψηλή έκφραση της HSP70 αποτελεί ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων και είναι απαραίτητη για την επιβίωση τους. Ειδικότερα, η HSP70, εντοπίζεται σε αφθονία στα καρκινικά κύτταρα, καταστέλλοντας την απόπτωση και επιτρέποντας έτσι την καρκινική μετάσταση (Albakova et al. 2020). Μετά την αντικαρκινική θεραπεία, η έκφραση της HSP70 αυξάνεται περαιτέρω λόγω των ισχυρών κυτταροπροστατευτικών ιδιοτήτων της, και η ποσότητα της κυτταρικής αυτής πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί αντιστρόφως με την ανταπόκριση στη θεραπεία (Boudesco et al.,2018). Εξαιτίας αυτού, έχει χαρακτηριστεί ως αρνητικός παράγοντας πρόγνωσης, λόγω της αντίστασης των κυττάρων στη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, και έτσι όσο υψηλότερα είναι τα ποσοστά της στα κύτταρα, τόσο δυσχερέστερη είναι η πρόγνωση. Επομένως, η εξάντληση της HSP70 ή η παρουσία αναστολέων της, μπορούν να επιφέρουν χημειοευαισθητοποιητικά αποτελέσματα ή ακόμα και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, αν και η υπερέκφραση της HSP70, πιστεύεται πως ευνοεί τις προκαρκινικές συνθήκες ανάπτυξης στα κύτταρα, επομένως η ύπαρξη της ευνοεί την εξέλιξη ορισμένων τύπων καρκίνου, δεν υπάρχουν προς το παρόν ερευνητικά δεδομένα που να αποδεικνύουν πως προκαλεί

καρκίνο η ίδια (Kasioumi et al., 2019). Βάση των παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα πως, η στόχευση της HSP70 αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου (BouDESCO et al., 2018). Σχετικά με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, η HSP70 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση της αρτηριακής υπέρτασης, καθώς η αύξηση της αρτηριακής πίεσης, αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα που διεγείρει την παραγωγή της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, διάφορα ευρήματα αποδεικνύουν την προστατευτική δράση της HSP70 έναντι της υπέρτασης, και έτσι η πιθανότητα παρέμβασης στην απόκριση της πρωτεΐνης, θα πρέπει να θεωρείται πιθανή θεραπευτική στρατηγική στην πρωτοπαθή υπέρταση (Rodriguez et al., 2023). Τέλος, η υψηλή έκφραση της HSP70 στον καρδιακό ιστό, έχει συσχετιστεί με την αύξηση της ανοχής των κυττάρων του μυοκαρδίου στην ισχαιμία, προστατεύοντας τα μυοκαρδιακά κύτταρα από το ισχαιμικό σοκ (Angelidis et al., 1999) και (Plumier et al., 1995), υποδηλώνοντας την υψηλή καρδιοπροστατευτική δράση της, τόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας όσο και σε καταστάσεις επαναϊμάτωσης του μυοκαρδίου (Hu et al., 2022). Επομένως, καθίσταται σαφές πως η κυτταροπροστατευτική δράση της HSP70, τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα είναι αδιαμφισβήτητη.

Ωστόσο σε καταστάσεις όπου η επαγόμενη από κάποιο ερέθισμα, υπερέκφραση της HSP70 επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία ενός οργανισμού, διαταράσσοντας την ομοιόστασή του και προκαλώντας την εμφάνιση κάποιας νόσου, απαιτείται παρέμβαση στο μηχανισμό υπερέκφρασης της πρωτεΐνης, ώστε να διασφαλιστεί η ομαλή λειτουργία του κυττάρου και κατ' επέκταση η επιβίωση του οργανισμού. Η έκφραση της HSP70, ρυθμίζεται σε γονιδιακό επίπεδο κατά τη μεταγραφή, από τον παράγοντα μεταγραφής HSF1, ο οποίος ενεργοποιείται ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Εφόσον ο ενεργοποιημένος HSF1 επάγει την έκφραση της HSP70, η αναστολή του παράγοντα αυτού, θα μπορούσε να αποτελεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για τον περιορισμό της έκφρασης της HSP70 στα κύτταρα. Η αναστολή της ενεργοποίησης του HSF1, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή (Kumar et al., 2016).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν, φυτικές πολυφαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Διαθέτουν μια ποικιλία ευεργετικών βιολογικών δραστηριοτήτων σε φυτά, βακτήρια, ζώα αλλά και ανθρώπους, καθώς εμφανίζουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμεταλλαξιογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες (Panche et al., 2016). Ειδικότερα, οι έρευνες για την αντικαρκινική δράση των φλαβονοειδών έχουν επικεντρωθεί, στην ανασταλτική δράση τους, έναντι των HSPs, και κυρίως της HSP70. Οι φυσικές αυτές ενώσεις, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου, μέσω της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της HSP70 (Moradi-Marjaneh et al., 2019). Διάφορα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί πως διαθέτουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της HSP70, όπως η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη-3, η οποία

καταστέλλει την έκφραση της HSP70, και κατ' επέκταση τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προκαλώντας κυτταροτοξικότητα, σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές (Tran et al., 2010). Αντίστοιχα, η κερσετίνη, ένα άλλο флаβονοειδές, αναστέλλει τη σύνθεση και την έκφραση της HSP70 σε πληθώρα καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών, έχοντας αντικαρκινική και αντινεοπλασματική δράση (Moradi-Marjaneh et al., 2019). Η εσπεριτίνη, ένα флаβονοειδές που βρίσκεται στα εσπεριδοειδή, διαθέτει αντικαρκινική δράση, μέσω της μείωσης της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων, της πρόκλησης της απόπτωσης αλλά και της μείωσης των επιπέδων της HSP70, ενός αρνητικού ρυθμιστή της οδού της μιτοχονδριακής απόπτωσης, που συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορα καρκινικά κύτταρα και ενοχοποιείται για την ανάπτυξη των όγκων. Έτσι η εσπεριτίνη, διαθέτει την ικανότητα μείωσης των επιπέδων της HSP70, παράλληλα ενισχύοντας τον μιτοχονδριακό αποπτωτικό καταρράκτη (Tanaka et al., 2022). Τέλος, η καμπφερόλη, αποτελεί ένα επιπλέον флаβονοειδές με αντικαρκινική και ηπατοπροστατευτική δράση, δρώντας ανασταλτικά έναντι της έκφραση της HSP70, τόσο της κυτοσολιακής όσο και της μιτοχονδριακής, σε ηπατοκύτταρα. Η καμπφερόλη περιορίζει σημαντικά τα βλαπτικά ερεθίσματα, όπως η τοξικότητα στα ηπατοκύτταρα, μέσω της συνεχούς αναστολής της HSP70 (Zhou et al., 2018). Συμπερασματικά, βάση των παραπάνω δεδομένων τα флаβονοειδή διαθέτουν σημαντικές ανασταλτικές ιδιότητες έναντι της HSP70, γεγονός που τους προσδίδει σημαντική αντικαρκινική δράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν δύο флаβονοειδή, η φισετίνη και η μορίνη, με σκοπό την *in vitro* αυτόνομη αλλά και συνδυαστική διερεύνηση της δράσης τους, τόσο σε φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών μυός (NIH/3T3) όσο και σε εμβρυικά κύτταρα μυός τα οποία υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 (Tg/Tg). Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της βιοσυμβατότητας και της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των δύο αυτών флаβονοειδών, καθώς επίσης και στην εξακρίβωση της κυτταροπροστατευτικής δράσης της HSP70 στα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα διερευνήθηκε και η πιθανή συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση των δύο ουσιών. Ειδικότερα, η πειραματική εφαρμογή των παραπάνω πραγματοποιήθηκε με δόσοεξαρτώμενες και χρονοεξαρτώμενες δοκιμασίες κυτταρικής επιβίωσης αλλά και με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, με σκοπό την ανίχνευση πιθανής παραγωγής ενδοκυτταρικών ΔΜΟ αλλά και την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου. Σε όλες τις πειραματικές διεργασίες, τα φυσιολογικά κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίστηκαν πιο ευάλωτα, σε σχέση με τα (Tg/Tg), έπειτα από την έκθεσή τους στα δύο υπό μελέτη флаβονοειδή, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στην ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση της HSP70. Παρόλα αυτά, και οι δύο κυτταρικές σειρές, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες στην τοξικότητα της φισετίνης, συγκριτικά με της μορίνης, καθώς η κυτταρική επιβίωση είναι σημαντικά μικρότερη. Η μορίνη φάνηκε να δρα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις,

αποκλειστικά στα κύτταρα (NIH/3T3), καθώς δεν επέφερε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα στις δοκιμασίες που υποβλήθηκαν τα κύτταρα Tg/Tg. Πιο συγκεκριμένα, στη δοκιμασία (MTT) στο πρώτο συνδυαστικό δοσολογικό σχήμα (1:1), στα κύτταρα (Tg/Tg) κατά τον συνδυασμό των δύο φλαβονοειδών, επιβεβαιώθηκε η μη τοξική δράση της μορίνης, καθώς η μείωση της βιωσιμότητας οφειλόταν αποκλειστικά στη δράση της φισετίνης. Στα κύτταρα (NIH/3T3), ενώ η μορίνη άσκησε κυτταροτοξική δράση σε δόσεις > 10  $\mu\text{M}$ , ωστόσο δεν παρατηρήθηκε συνδυαστική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας μαζί με τη φισετίνη. Παράλληλα, στο δεύτερο συνδυαστικό σχήμα με την προσθήκη επιπλέον συγκεντρώσεως 50  $\mu\text{M}$  φισετίνης, στα (Tg/Tg) η μικρή αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε δόσεις < 10  $\mu\text{M}$  και η μικρή μείωση σε δόσεις > 100  $\mu\text{M}$  μορίνης, σε σχέση με τη μείωση που προκάλεσε η φισετίνη (50 $\mu\text{M}$ ), δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Στα (NIH/3T3) κατά τον συνδυασμό των δύο φλαβονοειδών, η προσθήκη της φισετίνης (50  $\mu\text{M}$ ) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μορίνης μείωσε κατ' αναλογία και σε σταθερό ποσοστό τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας των κυττάρων. Πιθανόν λόγω συνεργιστικής δράσης των δύο ενώσεων.

Επιπρόσθετα, εντονότερη διαφορά στην επιβίωση και στο σχηματισμό αποικιών φαίνεται κατά την έκθεση των κυττάρων στη φισετίνη, όπου τα κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίζονται πιο ευαίσθητα. Στη κλωνογονική δοκιμασία των (Tg/Tg), η μείωση του SF μπορεί να αποδοθεί στην δράση της φισετίνης καθώς η μείωση της ικανότητας σχηματισμού αποικιών είναι αντίστοιχη των δόσεων της φισετίνης και μόνο, χωρίς τη συμβολή της μορίνης. Και στα (NIH/3T3) η ικανότητα αναστολής σχηματισμού αποικιών καθορίζεται αποκλειστικά από την κυτταροτοξική δράση της φισετίνης καθώς μακροχρόνια τελικά δεν εμφανίζεται συνεργιστική δράση. Επομένως, τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία σχηματισμού αποικιών πιθανόν να προτείνουν ότι τελικά η κυτταροτοξική δράση που προκλήθηκε από τη μορίνη και τη φισετίνη στη βραχεία δοκιμασία του (MTT) καθώς και η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από τη συνδυαστική τους δράση, να μην είναι αποτέλεσμα συνέργειας αλλά διαφορετικών μηχανισμών: στην περίπτωση της μορίνης ωστόσο οι όποιες βλάβες προκλήθηκαν μπόρεσαν και αναστάλθηκαν ενώ στην περίπτωση της φισετίνης οι βλάβες ήταν μη αντιστρεπτές και άρα δεν επέτρεψαν τη μακροχρόνια επιβίωση των κυττάρων. Εντούτοις, και τα δύο φλαβονοειδή, δεν δρουν μέσω της παραγωγής ΔΜΟ σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για τη διενέργεια μελλοντικών *in vitro* και *in vivo* ερευνών.

Όσον αφορά τη μελέτη του κυτταρικού κύκλου στις δύο κυτταρικές σειρές, τα δύο φλαβονοειδή δεν προκάλεσαν αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις συγκεντρώσεις που διερευνήθηκαν. Σε ανάλογες μελέτες σχετικά με την επίδραση της φισετίνης στο κυτταρικό κύκλο διαφόρων κυτταρικών σειρών, αποδείχθηκε πως το συγκεκριμένο φλαβονοειδές, αναστέλλει τις φάσεις

G0/G1, S και G2/M του κυτταρικού τόσο σε κύτταρα HL60 αλλά και σε αστροκύτταρα (Kashyap et al., 2019). Σε αστροκύτταρα επίμυος, η φισετίνη προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 και μείωσε το ποσοστό των κυττάρων στη φάση G2/M και S (Wang et al., 2017). Επιπλέον, σε κύτταρα επιδερμοειδούς καρκινώματος της σειράς A431, η φισετίνη ανέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη επάγοντας τη διακοπή της φάσης G2/M (Pal et al., 2013) ενώ σε αδενοκαρκινικά κύτταρα HeLa, επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M προκαλώντας απόπτωση (Afroze et al., 2022). Τέλος, σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε ανθρώπινη κυτταρική σειρά ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος HCT-116, όπου μελετήθηκε η ανασταλτική δράση της φισετίνης έναντι της HSP70, η φισετίνη σε συγκεντρώσεις (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M και 50  $\mu$ M) έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών, ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας αύξηση στην αναλογία του πληθυσμού των κυττάρων στη φάση sub-G1, με δοσοεξαρτώμενη δράση, υποδεικνύοντας την επαγόμενη από τη φισετίνη απόπτωση (Kim et al., 2015). Επομένως, τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω διενέργεια πειραμάτων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθώς και πειραμάτων απόπτωσης τόσο στα κύτταρα NIH/3T3 όσο και στα Tg/Tg, πιθανόν σε υψηλότερες δόσεις φισετίνης και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επώασης, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής δράση της στον κυτταρικό κύκλο των συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών.

Συμπερασματικά, μόνο η φισετίνη εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την HSP70, ιδιότητα που την καθιστά ιδανική επιλογή για τη μελέτη του ρόλου της στην αναστολή της δράσης της συγκεκριμένης HSP και στη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών σειρών που σχετίζονται με αυτή. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και βάση βιβλιογραφίας, καθώς η φισετίνη δρα ανταγωνιστικά έναντι της HSP70, αναστέλλοντας την επαγόμενη από θερμικό σοκ, πρόσδεση του HSF1 στον υποκινητή του γονιδίου της HSP70, εμποδίζοντας έτσι τη μεταγραφή και ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση της HSP70 (Kim et al., 2015). Επομένως, η φισετίνη διαθέτει σημαντική αντικαρκινική δράση, λειτουργώντας ως ένας ισχυρός αναστολέας του HSF1, αλλά και παρεμβαίνοντας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας απόπτωση. Ως εκ τούτου, ο HSF1 σε συνδυασμό με τη φισετίνη αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο, ως χημειοπροφυλακτικό παράγοντα ασθενών με καρκίνο (Kim et al., 2015). Αντίθετα, η μορίνη εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα, ωφέλιμων φαρμακολογικών επιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό, μεταξύ των οποίων και αντικαρκινική δράση (Rajput et al., 2021). Εντούτοις, όσον αφορά τη δράση της έναντι της HSP70, προς το παρόν δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα ερευνητικά δεδομένα, που να αποδεικνύουν κάποιο ανασταλτικό ή επαγωγικό μηχανισμό δράσης της μορίνης έναντι της HSP70 ή και κάποιας άλλης κατηγορίας πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Επομένως,



βιβλιογραφικά δεν αναφέρονται ερευνητικά δεδομένα που να συνδέουν τη μορίνη με την HSP70, όπως αντίθετα συμβαίνει με τη φισετίνη. Εν κατακλείδι, τόσο η φισετίνη όσο και η μορίνη, αλλά και όλα τα флаβονοειδή, στο μέλλον προβλέπεται να αποτελέσουν σημαντικούς αντικαρκινικούς φαρμακολογικούς, και όχι μόνο, στόχους της ερευνητικής κοινότητας. Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να σημειωθεί, πως τα δύο αυτά флаβονοειδή, διαθέτουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και απορρόφηση στον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως και μικρή βιοδιαθεσιμότητα, με αποτελέσματα η κλινική τους χρησιμότητα έναντι του καρκίνου, να είναι περιορισμένη, δυσχεραίνοντας έτσι τη χρήση τους προς όφελος του ανθρώπου (Kashyap et al., 2018). Επομένως, τα παραπάνω προβλήματα της χρήσης των δύο флаβονοειδών, καθώς και οι περιορισμένες έως τώρα γνώσεις σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητά τους, εξακολουθούν να περιορίζουν την πιθανή κλινική εφαρμογή, και υποδηλώνουν την ανάγκη για περαιτέρω διεξαγωγή *in vitro* και *in vivo* μελετών, ώστε να διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης τους (Kashyap et al., 2018). Σε γενικότερο πλαίσιο, βάση των πειραματικών δεδομένων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, συγκεντρωτικά εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα.

Όσον αφορά τη φισετίνη:

- Εμφάνισε ισχυρή δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, σημαντικά ισχυρότερη της μορίνης, και στα δύο είδη κυτταρικών σειρών, μειώνοντας κλιμακωτά την κυτταρική βιωσιμότητα.
- Δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα καθώς δρα τόσο στα κύτταρα Tg/Tg, όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα NIH/3T3.
- Αναστέλλει σημαντικά την ικανότητα των κυττάρων να αναπτύξουν αποικίες, καθώς στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, το ποσοστό του κλωνογόνου δυναμικού μειώθηκε έως 30% στα κύτταρα Tg/Tg, και έως 10% στα κύτταρα NIH/3T3.
- Δεν επάγει την παραγωγή ΔΜΟ σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές.
- Δεν προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις συγκεντρώσεις που διερευνήθηκαν.

Όσον αφορά τη μορίνη:

- Ανεξαρτήτου συκέντρωσης δεν εμφάνισε κάποια δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα Tg/Tg, καθώς η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν μηδενική. Αντίθετα στα κύτταρα NIH/3T3, μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις και έπειτα από χρονικό διάστημα επώασης 48 ωρών, σημειώθηκε ήπια δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση, όπου ποσοστό της κυτταρικής επιβίωσης δεν μειώθηκε κάτω από 60%.

- Εμφανίζει εκλεκτικότητα καθώς δρα μόνο στα κύτταρα NIH/3T3, σε υψηλές ωστόσο συγκεντρώσεις, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση της HSP70, η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στα κύτταρα Tg/Tg, έναντι της μορίνης.
- Δεν αναστέλλει σημαντικά την ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσουν αποικίες. Στα κύτταρα Tg/Tg, το κλωνογόνο δυναμικό των κυττάρων παρέμεινε σχεδόν σταθερό και αμετάβλητο σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, σε ποσοστό 80%. Αντίθετα, στα κύτταρα NIH/3T3, η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να επηρεάζεται ελαφρώς, εμφανίζοντας ήπια αναστολή της ικανότητας σχηματισμού αποικιών, καθώς το κλωνογόνο δυναμικό μειώθηκε σε ποσοστό 60%.
- Δεν επάγει την παραγωγή ΔΜΟ σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές.
- Δεν προκάλεσε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στις συγκεντρώσεις που διερευνήθηκαν.

## 5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε όλες τις πειραματικές διεργασίες που διεξήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα φυσιολογικά κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίστηκαν πιο ευάλωτα, σε σχέση με τα εμβρυικά κύτταρα μυός που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη HSP70 (Tg/Tg), έπειτα από την έκθεσή τους στα δύο υπό μελέτη φλαβονοειδή, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στην ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση της HSP70. Παρόλα αυτά, και οι δύο κυτταρικές σειρές, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητες στην τοξικότητα της φισετίνης, συγκριτικά με της μορίνης, καθώς η κυτταρική επιβίωση είναι σημαντικά μικρότερη. Επιπρόσθετα, εντονότερη διαφορά στην επιβίωση και στο σχηματισμό αποικιών φαίνεται κατά την έκθεση των κυττάρων στη φισετίνη, όπου τα κύτταρα (NIH/3T3) εμφανίζονται πιο επιρρεπή. Και τα δύο φλαβονοειδή δεν δρουν μέσω της παραγωγής ΔΜΟ σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές. Παρόλα αυτά, μόνο η φισετίνη εμφάνισε κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την HSP70, ιδιότητα που την καθιστά ιδανική επιλογή για τη μελέτη του ρόλου της στην αναστολή της δράσης της συγκεκριμένης HSP και στη μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών σειρών που σχετίζονται με αυτή. Εντούτοις, η ανάγκη για διενέργεια περαιτέρω μελετών σχετικά με τα δύο φλαβονοειδή είναι αδιαμφισβήτητη, καθώς χαρακτηριστικά όπως η βιοκατανομή, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης, καθώς και η πιθανή ύπαρξη μεταβολιτών τους, είναι απαραίτητο να διασαφηνιστούν. Ειδικότερα, η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης τους, μέσω περαιτέρω έρευνας και πειραματικών εφαρμογών όπως πειραμάτων απόπτωσης, νέκρωσης, έκφρασης αποπτωτικών πρωτεϊνών (Western Blot) αλλά και επαγωγής γονιδίων (Real Time PCR) είναι απαραίτητα ώστε να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά με ήδη γνωστά αντικαρκινικά, και όχι μόνο, φάρμακα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afroze, N., Pramodh, S., Shafarin, J., Bajbouj, K., Hamad, M., Sundaram, M. K., Haque, S., & Hussain, A. (2022). Fisetin deters cell proliferation, induces apoptosis, alleviates oxidative stress and inflammation in human cancer cells, HeLa. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1707.
- Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I., & Sapozhnikov, A. M. (2020). HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells (Basel, Switzerland)*, *9*(3), 587.
- Ambrose, A. J., & Chapman, E. (2021). Function, therapeutic potential, and inhibition of Hsp70 chaperones. *Journal of Medicinal Chemistry*, *64*(11), 7060–7082.
- Angelidis, C. E., Lazaridis, I., & Pagoulatos, G. N. (1991). Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance. *European Journal of Biochemistry*, *199*(1), 35–39.
- Angelidis, C. E., Lazaridis, I., & Pagoulatos, G. N. (1999). Aggregation of hsp70 and hsc70 in vivo is distinct and temperature-dependent and their chaperone function is directly related to non-aggregated forms. *European Journal of Biochemistry*, *259*(1–2), 505–512.
- Angelidis, C.E., Nova, C., Lazaridis, I., Kontoyiannis, D., Kollias, G., Pagoulatos, G.N. (1996). Overexpression of HSP70 in transgenic mice results in increased cell thermotolerance. *Transgenics*, *2* (1), pp. 111-117
- Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, *140*(111596), 111596.
- Balchin, D., Milicic, G., Strauss, M., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2018). Pathway of actin folding directed by the eukaryotic chaperonin TRiC. *Cell*, *174*(6), 1507-1521.e16.
- Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G., & Hartl, F. U. (2004). Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *15*(1), 17–29.
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, *146*(104720), 104720.
- Bolhassani, A., & Agi, E. (2019). Heat shock proteins in infection. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *498*, 90–100.
- Boudesco, C., Cause, S., Jegou, G., & Garrido, C. (2018). Hsp70: A cancer target inside and outside the cell. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1709*, 371–396.
- Candido, E. P. M. (2001). Heat Shock Proteins. In *Encyclopedia of Genetics* (pp. 914–915). Elsevier.
- Caruso Bavisotto, C., Alberti, G., Vitale, A. M., Paladino, L., Campanella, C., Rappa, F., Gorska, M., Conway de Macario, E., Cappello, F., Macario, A. J. L., & Marino Gammazza, A. (2020). Hsp60 post-translational modifications: Functional and pathological consequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 95.
- Chanet, A., Milenkovic, D., Manach, C., Mazur, A., & Morand, C. (2012). Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 8809–8822.

- Cheng, P., Yang, L., Huang, X., Wang, X., & Gong, M. (2020). Chalcone hybrids and their antimalarial activity. *Archiv Der Pharmazie*, 353(4), e1900350.
- Cui, L., Liu, X., Tian, Y., Xie, C., Li, Q., Cui, H., & Sun, C. (2016). Flavonoids, flavonoid subclasses, and esophageal cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Nutrients*, 8(6), 350.
- Delogu, G., Signore, M., Mechelli, A., & Famularo, G. (2002). Heat shock proteins and their role in heart injury. *Current Opinion in Critical Care*, 8(5), 411–416.
- Deriabina, A., Prutskij, T., Castillo Trejo, L., Sanchez Gutierrez, M. P., & Gonzalez Jimenez, E. (2022). Experimental and theoretical study of fluorescent properties of Morin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(15).
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5377.
- Duncan, E. J., Cheetham, M. E., Chapple, J. P., & van der Spuy, J. (2015). The role of HSP70 and its co-chaperones in protein misfolding, aggregation and disease. *Sub-Cellular Biochemistry*, 78, 243–273.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 116–134.
- Ghosh, P., Bag, S., Parveen, S., Subramani, E., Chaudhury, K., & Dasgupta, S. (2022). Nanoencapsulation as a promising platform for the delivery of the Morin-Cu (II) complex: Antibacterial and anticancer potential. *ACS Omega*, 7(9), 7931–7944.
- Grassi, S., Bisconti, M., Martinet, B., Arcolia, V., Simon, J.-F., Wattiez, R., Leroy, B., & Hennebert, E. (2022). Targeted analysis of HSP70 isoforms in human spermatozoa in the context of capacitation and motility. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12).
- Hagymasi, A. T., Dempsey, J. P., & Srivastava, P. K. (2022). Heat-shock proteins. *Current Protocols*, 2(11), e592.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332.
- Hoter, A., El-Sabban, M. E., & Naim, H. Y. (2018). The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2560.
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3), e161.
- Jin, Y.-S. (2019). Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(19), 126589.
- Kampinga, H. H., & Garrido, C. (2012). HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(10), 1706–1710.
- Kashyap, D., Garg, V. K., Tuli, H. S., Yerer, M. B., Sak, K., Sharma, A. K., Kumar, M., Aggarwal, V., & Sandhu, S. S. (2019). Fisetin and quercetin: Promising flavonoids with chemopreventive potential. *Biomolecules*, 9(5), 174.

- Kashyap, D., Sharma, A., Sak, K., Tuli, H. S., Buttar, H. S., & Bishayee, A. (2018). Fisetin: A bioactive phytochemical with potential for cancer prevention and pharmacotherapy. *Life Sciences*, *194*, 75–87.
- Kasioumi, P., Vrazeli, P., Vezyraki, P., Zerikiotis, S., Katsouras, C., Damalas, A., & Angelidis, C. (2019). Hsp70 (HSP70A1A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells. *International Journal of Oncology*, *54*(3), 821–832.
- Kędzierska-Mieszkowska, S., & Zolkiewski, M. (2021). Hsp100 molecular chaperone ClpB and its role in virulence of bacterial pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), 5319.
- Kim, J. A., Lee, S., Kim, D.-E., Kim, M., Kwon, B.-M., & Han, D. C. (2015). Fisetin, a dietary flavonoid, induces apoptosis of cancer cells by inhibiting HSF1 activity through blocking its binding to the hsp70 promoter. *Carcinogenesis*, *36*(6), 696–706.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, *82*(1), 323–355.
- Kıyga, E., Şengelen, A., Adıgüzel, Z., & Önay Uçar, E. (2020). Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells. *Molecular Biology Reports*, *47*(7), 4957–4967.
- Kohler, V., & Andréasson, C. (2020). Hsp70-mediated quality control: should I stay, or should I go? *Biological Chemistry*, *401*(11), 1233–1248.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- Kumar, S., Stokes, J., 3rd, Singh, U. P., Scissum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters*, *374*(1), 156–166.
- Lackie, R. E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V. G., Marques-Lopes, J., Choy, W.-Y., Duennwald, M. L., Prado, V. F., & Prado, M. A. M. (2017). The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 254.
- Larburu, N., Adams, C. J., Chen, C.-S., Nowak, P. R., & Ali, M. M. U. (2020). Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response. *Open Biology*, *10*(8), 200089.
- Lee, G., Kim, R. S., Lee, S. B., Lee, S., & Tsai, F. T. F. (2022). Deciphering the mechanism and function of Hsp100 unfoldases from protein structure. *Biochemical Society Transactions*, *50*(6), 1725–1736.
- Lund, P. A. (2001). Microbial molecular chaperones. *Advances in Microbial Physiology*, *44*, 93–140.
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, *299*(125124), 125124.
- Martínez-Castillo, M., Pacheco-Yepez, J., Flores-Huerta, N., Guzmán-Téllez, P., Jarillo-Luna, R. A., Cárdenas-Jaramillo, L. M., Campos-Rodríguez, R., & Shibayama, M. (2018). Flavonoids as a Natural Treatment Against *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 209.
- Middleton, E., Jr. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *439*, 175–182.

- Mishra, R. C., & Grover, A. (2016). ClpB/Hsp100 proteins and heat stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5), 862–874.
- Moradi-Marjaneh, R., Paseban, M., & Moradi Marjaneh, M. (2019). Hsp70 inhibitors: Implications for the treatment of colorectal cancer. *IUBMB Life*, 71(12), 1834–1845.
- Morrow, G., & Tanguay, R. M. (2012). Small heat shock protein expression and functions during development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(10), 1613–1621.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181–1188.
- Naka K, K., Vezyraki, P., Kalaitzakis, A., Zerikiotis, S., Michalis, L., & Angelidis, C. (2014). Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice. *Cell Stress & Chaperones*, 19(6), 853–864.
- Nakamura, H., & Minegishi, H. (2013). HSP60 as a drug target. *Current Pharmaceutical Design*, 19(3), 441–451.
- Nguyen, W., Grigori, L., Just, E., Santos, C., & Seleem, D. (2021). The in vivo anti-Candida albicans activity of flavonoids. *Journal of Oral Biosciences*, 63(2), 120–128.
- Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., & Scarpa, E. S. (2020). Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. *Nutrients*, 12(9), 2534.
- Oliveira, A. A., Mendoza, V. O., Rastogi, S., & Nunes, K. P. (2022). New insights into the role and therapeutic potential of HSP70 in diabetes. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 178(106173), 106173.
- Oosten-Hawle, P. (2023). Organismal roles of Hsp90. *Biomolecules*, 13(2), 251.
- Pal, H. C., Sharma, S., Elmets, C. A., Athar, M., & Afaq, F. (2013). Fisetin inhibits growth, induces G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells: role of mitochondrial membrane potential disruption and consequent caspases activation. *Experimental Dermatology*, 22(7), 470–475.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e47), e47.
- Plumier, J. C., Ross, B. M., Currie, R. W., Angelidis, C. E., Kazlaris, H., Kollias, G., & Pagoulatos, G. N. (1995). Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *The Journal of Clinical Investigation*, 95(4), 1854–1860.
- Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *The Biochemical Journal*, 473(16), 2439–2452.
- Rajput, S. A., Wang, X.-Q., & Yan, H.-C. (2021). Morin hydrate: A comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 138(111511), 111511.
- Ramesh, P., Jagadeesan, R., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., & Vimalraj, S. (2021). Flavonoids: Classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 779638.

- Ray, R. (2018). Escherichia coli subtilase cleaves cell surface GRP78 preventing COOH-terminal domain signaling. In S. V. Pizzo (Ed.), *Cell Surface GRP78, a New Paradigm in Signal Transduction Biology* (pp. 111–126). Elsevier.
- Rehman, S. U., Nadeem, A., Javed, M., Hassan, F.-U., Luo, X., Khalid, R. B., & Liu, Q. (2020). Genomic identification, evolution and sequence analysis of the heat-shock protein gene family in buffalo. *Genes*, *11*(11), 1388.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, *18*(12), 571–573.
- Rodriguez-Iturbe, B., Johnson, R. J., Sanchez-Lozada, L. G., & Pons, H. (2023). HSP70 and primary arterial hypertension. *Biomolecules*, *13*(2).
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(11), 665–680.
- Samanta, Amallesh & Das, Gouranga & Das, Sanjoy. (2011). Roles of flavonoids in Plants. *International Journal of pharmaceutical science and technology*. 6. 12-35.
- Schopf, F. H., Biebl, M. M., & Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *18*(6), 345–360.
- Sharma, D., & Masison, D. (2009). Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein and Peptide Letters*, *16*(6), 571–581.
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *383*(132531), 132531.
- Shende, P., Bhandarkar, S., & Prabhakar, B. (2019). Heat shock proteins and their protective roles in stem cell biology. *Stem Cell Reviews*, *15*(5), 637–651.
- Solairaja, S., Andrabi, M. Q., Dunna, N. R., & Venkatabalasubramanian, S. (2021). Overview of Morin and its complementary role as an adjuvant for anticancer agents. *Nutrition and Cancer*, *73*(6), 927–942.
- Sundarraj, K., Raghunath, A., & Perumal, E. (2018). A review on the chemotherapeutic potential of fisetin: In vitro evidences. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, *97*, 928–940.
- Tanaka, M., Endo, H., Sakusa, K., & Yano, M. (2022). Hesperetin induces apoptosis in A549 cells via the Hsp70-mediated activation of Bax. *International Journal of Oncology*, *61*(6).
- Tedesco, B., Ferrari, V., Cozzi, M., Chierichetti, M., Casarotto, E., Pramaggiore, P., Mina, F., Galbiati, M., Rusmini, P., Crippa, V., Cristofani, R., & Poletti, A. (2022). The role of small heat shock proteins in protein misfolding associated motoneuron diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11759.
- Todaro, G. J., & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, *17*(2), 299–313.
- Tran, P. L. C. H. B., Kim, S.-A., Choi, H. S., Yoon, J.-H., & Ahn, S.-G. (2010). Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, *10*(1), 276.



Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., & Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5243.

Wang, N., Yao, F., Li, K., Zhang, L., Yin, G., Du, M., & Wu, B. (2017). Fisetin regulates astrocyte migration and proliferation in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(4), 783–790.

Xing, H., Mayhew, C. N., Cullen, K. E., Park-Sarge, O.-K., & Sarge, K. D. (2004). HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10551–10555.

Zerikiotis, S., Angelidis, C., Dhima, I., Naka, K. K., Kasioumi, P., Kalfakakou, V., Peschos, D., & Vezyraki, P. (2019). The increased expression of the inducible Hsp70 (HSP70A1A) in serum of patients with heart failure and its protective effect against the cardiotoxic agent doxorubicin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 455(1–2), 41–59.

Zhou, B., Jiang, Z., Li, X., & Zhang, X. (2018). Kaempferol's protective effect on ethanol-induced mouse primary hepatocytes injury involved in the synchronous inhibition of SP1, Hsp70 and CYP2E1. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46(05), 1093–1110.