



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ, ΤΜΗΜΑΤΩΝ
ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Abies alba* ΚΑΙ *Viscum album subsp. abietis* ΚΑΙ
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ
ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΚΑΙ ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ**

Ιωάννης Π. Ζελοβίτης

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Ζελοβίτη Ιωάννη: 7-10-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 380^α/18-5-1999

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευθυμιάδης Παναγιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών
Μάλαμας Μιχάλης Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 25-5-1999

«Απομόνωση δραστικών εκχυλισμάτων, Τμημάτων των φυτών Abies Alba και Viscus album και μελέτη των επιδράσεων τους στον πολλαπλασιασμό κακοθών σαρκοματικών κυττάρων και σαρκοματικών επίμυων»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 642^α/8-7-2008

Ανωγειανάκης Γεώργιος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευθυμιάδης Παναγιώτης Καλφακάκου Βασιλική	Καθηγητής Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος –Νικηφόρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαραλαμπόπουλος Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Λειτουργική –Κλινική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-6-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Αφιερωμένο
στην Κωνσταντίνα τον Παναγιώτη
και την Μαριάννα

« καὶ ἐπὶ τοῦ ποταμοῦ ἀναβήσεται, ἐπὶ τοῦ χεῖλους αὐτοῦ ἔνθεν καὶ ἔνθεν πᾶν ξύλον βρώσιμον, οὐ μὴ παλαιωθῆ ἐπ' αὐτοῦ, οὐδὲ μὴ ἐκλείπη ὁ καρπὸς αὐτοῦ· τῆς καινότητος αὐτοῦ πρωτοβολήσει, διότι τὰ ὕδατα αὐτῶν ἐκ τῶν ἀγίων ταῦτα ἐκπορεύεται, καὶ ἔσται ὁ καρπὸς αὐτῶν εἰς βρῶσιν καὶ ἀνάβασις αὐτῶν εἰς ὑγίειαν.»

Ιεζεκιήλ, ΜΖ. 12.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σημερινή εποχή, στην οποία αναπτύχθηκε η ανά χείρας μελέτη, χαρακτηρίζεται από μια σημαντική αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου, η οποία πλέον εδώ και μερικά χρόνια αποκτά έναν ανησυχητικό ρυθμό ακόμη και για την δική μας μη βιομηχανική χώρα. Η βασικότερη αιτία αυτής της δυσάρεστης επιδημιολογικής εικόνας σχετίζεται με την όλο και μεγαλύτερη αύξηση της ρύπανσης, στην περιοχή των Βαλκανίων, και στην ευρύτερη περιοχή της λεκάνης της Μεσογείου καθώς επίσης στη υποβαθμισμένη ποιότητα διαφόρων βρώσιμων προϊόντων και η απομάκρυνσή μας από την παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή που μας χαρακτήριζε.

Υπό την έννοια αυτή είμαστε υποχρεωμένοι εκ των πραγμάτων να συνυπάρξουμε με έναν αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης τόσο ημών των ιδίων όσο και των αγαπημένων μας προσώπων, οπότε, τόσο ως απλοί πολίτες κι ακόμη περισσότερο σαν επιστήμονες δεν μπορούμε να μείνουμε με δεμένα τα χέρια αλλά να κάνουμε κάτι προκειμένου να διορθώσουμε έστω και λίγο την κατάσταση.

Αυτό σημαίνει ότι είμαστε υποχρεωμένοι να δώσουμε μια μικρή αλλά ουσιαστική συνεισφορά, στον αγώνα κατά του καρκίνου και να μην επαναπαυόμαστε απλώς στην οικονομική ενίσχυση του ετήσιου αντικαρκινικού εράνου ή στην προπαγάνδα εναντίον του καπνίσματος, πράξεις φυσικά εξίσου καλοπροαίρετες αλλά δυστυχώς ανεπαρκείς.

Μέσα στα πλαίσια αυτής της ανάγκης ανέλαβα την πραγματοποίηση της ανά χείρας διδακτορικής διατριβής ευαισθητοποιημένος από την αρρώστια και εν τέλει τον θάνατο της πολυαγαπημένης μου μητέρας από τη συγκεκριμένη νόσο. Δεν θα ήθελα να αναφέρω περισσότερα για το γεγονός, ωστόσο πρέπει να υπογραμμίσω ότι το βασικό μου κίνητρο ήταν αυτό κι όχι κάποιο άλλο.

Η επαγγελματική και φιλική σχέση που είχα αναπτύξει με ερευνητές του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, καθώς και το γεγονός ότι στο Εργαστήριο αυτό γινόταν και γίνεται η προσπάθεια ανάπτυξης νέων φαρμάκων κατά του καρκίνου, με βοήθησε να προσανατολιστώ και να αξιοποιήσω τις γνώσεις

του δικού μου πεδίου επί του θέματος, οπότε στράφηκα να μελετήσω διάφορα φυτά με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Έτσι μελέτησα, μέσα πάντοτε στα πλαίσια των δυνατοτήτων που διατίθεντο, τις αντικαρκινικές ιδιότητες μερικών γηγενών ποικιλιών δύο συμβιωτικών φυτών του *Viscum album* και του *Abies alba*. Το *Viscum album* δεν είναι αυτόνομο φυτό, καθόσον δεν διαθέτει πλήρως αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, αλλά μπορεί να επιβιώσει μόνον ως επίφυτο διεισδύοντας στους χυμοφόρους ιστούς ενός ξενιστή.

Το *Viscum album* έχει χαρακτηριστεί ως φανερόγαμο ζιζάνιο αλλά από την άλλη πλευρά αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα θεραπευτικώς χρησιμοποιούμενα φυτά, εξ αιτίας των πολλών και ποικίλων θεραπευτικών του ιδιοτήτων. Φαίνεται ότι οι θεραπευτικές ιδιότητες του *Viscum album* σχετίζονται, τρόπον τινά, με το είδος του ξενιστή επί του οποίου αναπτύσσεται το εν λόγω φυτό.

Υπήρχαν κάποιες κλινικές παρατηρήσεις προερχόμενες κυρίως από ιατρούς που υπηρετούσαν σε αγροτικές περιοχές της Ηπείρου και της Θεσσαλίας ότι τα αφεψήματα που προερχόταν από τα συμβιωτικά φυτά *Viscum album* και *Abies alba* παρουσίαζαν σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο σε καρκινοπαθείς ανθρώπους με προχωρημένη νεοπλασματική νόσο, όσο και σε καρκινοπαθή αγροτικά ζώα. Δεδομένου ότι οι πληροφορίες αυτές συνοδευόταν και από αξιόλογο εργαστηριακό υλικό, το Εργαστήριο Φυσιολογίας άρχισε να μελετά τις ιδιότητες των δύο εν λόγω φυτών σε διάφορα μοντέλα καρκίνου.

Η ειδικότητά μου ως γεωπόνου – βοτανολόγου θα μπορούσε να βοηθήσει τον εντοπισμό εκείνων των ποικιλιών συμβιωτικών φυτών που έδιναν τις καλύτερες δράσεις.

Εφ' όσον προσδιορίσαμε τις περιοχές διάδοσης των εν λόγω φυτών στην Ήπειρο, επιλέξαμε διάφορες περιοχές στις οποίες τα δύο εν λόγω συμβιωτικά φυτά παρουσίαζαν μια ιδιαίτερως αυξημένη πληθυσμιακή δυναμική και αρχίσαμε να μελετάμε, κατ' αρχάς τα βοτανολογικά τους χαρακτηριστικά και εν συνεχεία τις βιολογικές δράσεις των υδατικών και αιθανολικών τους εκχυλισμάτων.

Το πλάνο της συνολικής μας μελέτης περιέλαβε τα ακόλουθα βήματα:

- 1^ο) Εντοπισμός περιοχών με μεγάλη πληθυσμιακή διάδοση των δύο συνεργούντων φυτών.
- 2^ο) Επιλογή των φυτών με καλή ανάπτυξη και σαφή τυπικά χαρακτηριστικά.
- 3^ο) Απομόνωση και επεξεργασία των διαφόρων ιστών των φυτών προκειμένου να παράγουμε αιθανολικά εκχυλίσματά τους για μελέτη των βιολογικών τους δράσεων.
- 4^ο) Παρασκευή των εκχυλισμάτων των εξής τμημάτων των εν λόγω φυτών: Φύλλα, βλαστοί, φλοιός, καρποί, ξυλώδη τμήματα και σημεία συνέργιας των δύο φυτών.
- 5^ο) Απομάκρυνση της αλκοόλης σε ρεύμα αζώτου, ζύγιση του υπολείμματος και ανασύστασή του με διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα, κατάλληλα για χορήγηση στα υπό μελέτη βιολογικά μοντέλα.
- 6^ο) Διήθηση των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων για την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών και μικροβίων.
- 7^ο) Δοκιμασίες βιολογικών δράσεων των εκχυλισμάτων στα ακόλουθα συστήματα:
 - α) Καρκινικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμους Wistar.
 - β) Πρόκληση χημικής καρκινογένεσης με 3,4-βενζοπυρένιο και δοκιμασία αναστολής της μέσω των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων σε επίμους Wistar.
 - γ) Δοκιμασία των ογκολυτικών δράσεων των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων σε επίμους Wistar που ανέπτυξαν νεοπλασματική νόσο μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμους Wistar.
 - δ) Μελέτη των αντιμεταστατικών δράσεων των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων σε επίμους στους οποίους έγινε ενδοφλέβιος ενοφθαλμισμός μεγάλων αριθμών καρκινικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμους Wistar.
 - ε) Μελέτη των δράσεων των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων σε υγιείς επίμους Wistar (μελέτη οξείας και χρόνιας τοξικότητας).

- στ)** Μελέτη των δράσεων των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων στην συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου μέσω των φυσιολογικών αγωνιστών αυτής και μέσω συσσώρευσης δια καρκινικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος και αναζήτηση των μοριακών μηχανισμών δράσης (προσδιορισμός επιπέδων θρομβοξάνης A2 και ποσοστό έκφρασης του αιμοπεταλιακού υποδοχέα ινωδογόνου GP II b III a).
- ζ)** Μελέτη των δράσεων των εκχυλισμάτων στην δραστηριότητα του ενζύμου 5 – λιποξυγονάση.
- η)** Μελέτη των διεγερτικών δράσεων των ανασυσταθέντων εκχυλισμάτων επί των κυτταροτοξικών ιδιοτήτων λεμφοκυττάρων τύπου Φυσικών Φονέων εναντίον καρκινικών κυττάρων απομονωθέντων από αδenoκαρκίνωμα πνεύμονος ανθρώπου, με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.
- θ)** Μελέτη της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ισχύος του ανασυσταθέντος εκχυλίσματος και συσχέτιση των συνολικών βιολογικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.
- ι)** Ιστολογική μελέτη των όγκων που παρήχθησαν καθώς και των σπλάχνων των πειραματόζων.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την συνολική μελέτη δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα και των δύο φυτών έχει σημαντικές αντικαρκινογόνες, αντικαρκινικές, αντιαιμοπεταλιακές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα στις in vivo δοκιμασίες. Τα δεδομένα αυτά δημιουργούν μια βάσιμη αισιοδοξία για την περαιτέρω συνέχιση της μελέτης προς δύο κατευθύνσεις:

- 1^ο)** Προς την κατεύθυνση της απομόνωσης των ενεργών συστατικών των δύο φυτών και
- 2^ο)** Προς την κατεύθυνση της κλινικής δοκιμής των εκχυλισμάτων σε καρκινοπαθείς εθελοντές προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι αντικαρκινικές δράσεις τους εκφράζονται και στο επίπεδο του ανθρώπινου οργανισμού, όπως κάποιες ενδείξεις δείχνουν ότι συμβαίνει.

Η διατριβή μου πραγματοποιήθηκε σχεδόν εξ ολοκλήρου μέσα στα πλαίσια και με τις υποδομές του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ ένα μικρό, αλλά σημαντικό μέρος μετρήσεων έγιναν στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και στο Τμήμα Κυτταρομετρίας Ροής των Κλινικών Εργαστηρίων του Δρ. Σπύρου Γέρου.

Επειδή το θέμα περιείχε τμήματα τα οποία εξήρχοντο της ειδικότητάς μου ως Γεωπόνου συμβουλευτήκα επιστήμονες πολλών ειδικοτήτων, προκειμένου να λάβω την απαραίτητη τεχνογνωσία που ήταν σημαντική για την εκτέλεση των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Μέσα στα πλαίσια αυτών των συνεργασιών, καταθέτοντας αυτή τη μελέτη, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη και να ευχαριστήσω θερμά τους ακόλουθους Επιστήμονες:

Τον Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Άγγελο Ευαγγέλου, Ιατρό Παθολόγο, για την ουσιαστική επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής και για τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης καθώς επίσης για την υπομονή και τη στήριξη που μου παρείχε απλόχερα, σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα σε προσωπικό και ερευνητικό επίπεδο, κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Τον Καθηγητή Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Παναγιώτη Ευθυμιάδη, ο οποίος συμμετείχε ενεργά στην Τριμελή Επιτροπή της Διατριβής μου και αποτελεί για μένα τον άνθρωπο που μου μεταλαμπάδευσε την αγάπη του για την επιστήμη της Γεωπονίας.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Δρ. Μιχάλη Μάλαμα ο οποίος συμμετείχε ενεργά και όποτε χρειάστηκε στην Τριμελή Επιτροπή της Διατριβής μου.

Θεωρώ το λιγότερο υποχρέωσή μου να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και φίλο Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα,

χωρίς την πολύτιμη συμβολή του οποίου δεν θα μπορούσε ποτέ να ολοκληρωθεί η παρούσα μελέτη, για την ακούραστη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια, τόσο στην απόκτηση της απαραίτητης τεχνογνωσίας και μύησης σε βασικές αρχές, έννοιες και τεχνικές της Ιατρικής επιστήμης, όσο στη σχεδίαση και εκτέλεση πολυάριθμων σημαντικών πειραμάτων, καθώς και για την υποστήριξή του σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Τον Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα ευχαριστώ θερμά για την εμφύχωση και στήριξη που μου παρείχε πολλές φορές με σκοπό την προώθηση της μελέτης, ιδιαίτερα όταν διάφοροι παράγοντες έκαναν δύσκολη την ολοκλήρωση της εργασίας, καθώς επίσης για την πολυτιμότερη βοήθεια του κατά την συγγραφή της και για τις άπειρες ώρες εποικοδομητικών συζητήσεων και ανταλλαγής απόψεων όλα αυτά τα χρόνια.

Στους Καθηγητές Άγγελο Ευαγγέλου και Σπύρο Καρκαμπούνα, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου, γιατί μου έδωσαν την ευκαιρία να γνωρίσω και να πορευτώ σε νέους δρόμους, άγνωστους και διαφορετικούς με αυτούς που αντιπροσωπεύονται από τις βασικές μου σπουδές ως Γεωπόνου, αποδεικνύοντας μου με αξιοθαύμαστο τρόπο την μοναδικότητα της επιστήμης, με τον συνδυασμό των επιμέρους επιστημών.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Βασιλική Καλφακάκου, ως μέλος της Επταμελούς Επιτροπής για την ανάγνωση της διατριβής και τις υπερπολύτιμες επισημάνσεις της, αλλά κυρίως για τη στήριξη και τη βοήθειά της, σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα κατά την εκπόνησή της.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Δρ. Γεώργιο Ανωγειανάκη, Τον καθηγητή Φυσιολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης Κων/νο Χαραλαμπόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Δημήτριο Κιόρτση, ως μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την ανάγνωση της παρούσας διατριβής και τις υπερπολύτιμες επισημάνσεις τους.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, τον Δρ. Μιχάλη Καραμούζη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, την Δρ. Πάτρα Βεζυράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Φυσιολογίας, τον Δρ. Κωλέτα Ευάγγελο, Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας, τον Δρ. Νικηφόρο Αποστολίκα, Παθολογοανατόμο, Διευθυντή Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Άγιος Σάββας», τον Δρ. Ιωάννη Τολιόπουλο, Μοριακό Βιολόγο, Διδάκτορα Φυσιολογίας, για την πολύτιμη συμβολή τους στα διάφορα στάδια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Παναγιώτη Λέκκα, Ζωοτέχνη, Υποψήφιο Διδάκτορα Φυσιολογίας και την Κατερίνα Στεφάνου, Χημικό, για την πολύτιμη βοήθειά τους σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα που έγιναν μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Ρομάν Λιασκό Βιολόγο, την υποψήφια διδάκτορα και Βιολόγο κ. Τζέιν Μπινόλη, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα και Βιολόγο κ. Αναστασιάδου Χρυσούλα για τη πολύτιμη μεταφορά γνώσεων, σε διάφορα επιστημονικά θέματα, του δικού τους επιστημονικού πεδίου και για τη στήριξη τους σε όλες τις φάσεις της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, είναι το λιγότερο που θα μπορούσα να πω στην κ. Μαριάννα Βλάχου Γεωπόνου – Φυτοτέχνη, η οποία με βοήθησε απεριόριστα, τόσο στην τεχνική προπαρασκευής και εκτέλεσης όλων των πειραμάτων αυτής της εργασίας, καθώς επίσης για την ενθάρρυνση και την υποστήριξη που μου παρείχε αφειδώς κατά την διάρκεια της μελέτης και μέχρι της ολοκλήρωσής της, με μοναδικό τρόπο.

Θα πρέπει επίσης να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κυρίως τον κ. Γκάλλκο Νίκο, τον κ. Γρίβα Παναγιώτη, την κ. Γούλα Ευτυχία και την κυρία Τζίμα Χριστίνα, για την οποιαδήποτε βοήθεια και κατανόηση προσέφερε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής και για την εξαιρετική συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια που βρίσκομαι στο Εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω τη μελέτη αυτή, στην ιερή μνήμη της μητέρας μου και του πατέρα μου που δυστυχώς δεν έζησαν για να δουν την περάτωση αυτής της προσπάθειας, αλλά που με στήριξαν υλικά και πνευματικά για να την πραγματοποιήσω, τόσο ως παρουσίες όσο και ως αγαπημένα απόντα πρόσωπα.

Επίσης την αφιερώνω στα παιδιά μου Κωνσταντίνα και Παναγιώτη, που αντικατέστησαν με τον καλύτερο τρόπο την απώλεια των γονιών μου και φυσικά στη σύζυγό μου Μαριάννα που με στήριξε και με στηρίζει σε κάθε μου επιλογή.

Αφιερώνω ακόμη την εν λόγω διατριβή σε όλους τους δασκάλους και καθηγητές μου, που μου παρείχαν όλα τα επιστημονικά και πνευματικά εφόδια για να μπορέσω να την ολοκληρώσω, καθώς επίσης στους ερευνητές που αγωνίζονται ενάντια στον καρκίνο και σε όλους τους ανθρώπους που είχαν την ατυχία να προσβληθούν από καρκίνο και τους παροτρύνω νοερά να συνεχίσουν τον δύσκολο και επώδυνο αγώνα τους ενάντια στην νόσο γιατί φυσικά υπάρχει ελπίδα για την πλήρη και παντοτινή της εκρίζωση.

Ένα μικρό τμήμα αυτής της ελπίδας πιστεύω ότι αντιπροσωπεύεται και από το μικρό μου αυτό ερευνητικό πόνημα, ελπίζοντας πάντοτε ότι θα ακολουθήσουν κι άλλοι ερευνητές που με τις προσπάθειές τους θα μπορέσουν να συνεχίσουν και να δώσουν απαντήσεις σε όσα δεν μπόρεσε να απαντήσει η παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
(ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΜΕΡΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ)	17
I. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	17
A. Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες δρουν προκαλώντας	28
B. Οι κλασικοί οργανικοί χημικοί καρκινογόνοι παράγοντες	29
Γ. Τα μέταλλα με καρκινογόνες ιδιότητες	31
Δ. Δράσεις ογκογόνων ιών επί του DNA	32
E. Ο πιθανός ρόλος της αραχιδονικής οδού στην καρκινογένεση	36
ΣΤ. Ενεργειακές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων	38
II. ΓΕΓΟΝΟΤΑ ΣΥΜΒΑΙΝΟΝΤΑ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΚΟΗΘΗ ΕΞΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥΣ	39
A. Ταξινόμηση ογκοπρωτεϊνών σχετικώς με τη λειτουργία τους	44
B. Ο ρόλος της απόπτωσης	52
Γ. Ο ρόλος των τελομερών	53
III. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΜΕΣΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	57
A. Η θεραπευτική των κακοηθών όγκων σε συνάρτηση με την βιολογία του καρκίνου	57
IV. ΦΑΡΜΑΚΑ, ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	64
A. Αλκυλιωτικοί παράγοντες	65
B. Αντιμεταβολίτες	67
B.1. Ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος	68
B.2. Ανάλογα των πυριμιδινών	69
B.3. Ανάλογα των πουρινών	70
Γ. Φυτικά αλκαλοειδή	71
Δ. Αντινεοπλασματικά αντιβιοτικά	72

E. Μικτοί αντικαρκινικοί παράγοντες	76
1. Η υδροξουρία	76
2. Η προκαρβαζίνη	77
3. Οι νιτροζουρίες	77
4. Η ιμιδαζολ – καρβοξαμίδη	78
5. Το ένζυμο ασπαραγινάση	79
ΣΤ. Ορμονοθεραπεία του καρκίνου	79
1. Οιστρογόνα	80
2. Ανδρογόνα	81
3. Γεσταγόνα	81
4. Κορτικοστεροειδή των επινεφριδίων	81
5. Θυροξίνη	82
Z. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	87
ΒΟΤΑΝΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ <i>Viscum album</i> & <i>Abies alba</i> ΚΑΙ ΓΝΩΣΤΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ	87
A. <i>Viscum album</i> . Λευκός Ιξός	87
I. Γενικά	87
II. Βοτανική ταξινόμηση και περιγραφή του <i>Viscum album</i>	89
1. <i>Viscum cruciatum</i>	91
2. <i>Viscum album</i>	91
α) <i>Viscum album</i> subsp. <i>album</i>	92
β) <i>Viscum album</i> subsp. <i>abietis</i>	93
γ) <i>Viscum album</i> subsp. <i>austriacum</i>	93
III. Βιολογία – Πολλαπλασιασμός – Συστατικά	93
IV. Φαρμακευτικές ιδιότητες και χρήσεις του <i>Viscum album</i>	95
B. <i>Abies alba</i> . Έλατο	109
1. <i>Abies alba</i> . Ελάτη λευκή ή χτενοειδής	109
2. <i>Abies cephalonica</i> . Ελάτη Κεφαλληνιακή	110
3. <i>Abies alba</i> x <i>Abies cephalonica</i> , (<i>A. borisii regis</i>) Υβρίδιο	111
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	113
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO	113
A. Στρατηγική και σχεδιασμός των πειραμάτων	113

B. Συλλογή φυτών <i>Viscum album</i> & <i>Abies alba</i> και Παρασκευή εκχυλισμάτων	119
Γ. Απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης από τα αιθανολικά φυτικά εκχυλίσματα των <i>Viscum album</i> & <i>Abies alba</i>	122
Δ. Χημική καρκινογένεση και έλεγχος αναστολής της, μέσω του εκχυλίσματος των <i>Viscum album</i> και <i>Abies alba</i> – Απομόνωση καρκινικών κυττάρων από όγκο αναπτυχθέντος δια 3,4 B[a]P σε επίμυες	126
Δ1. Μοντέλο χημικής καρκινογένεσης	126
α) Προπαρασκευή του καρκινογόνου	128
I) Χορήγηση του καρκινογόνου στους επίμυες Wistar	129
II) Πειράματα αναστολής χημικής καρκινογένεσης με μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών (<i>Viscum album</i> και <i>Abies alba</i>)	130
Δ2. Δημιουργία κυτταρικής σειράς μέσω απομόνωσης και καλλιέργειας νεοπλασματικών κυττάρων από αναπτυχθέντα όγκο με B[a]P σε επίμυ Wistar	131
E. Πειράματα βιολογικών δράσεων των εκχυλισμάτων των <i>Viscum album</i> και <i>Abies alba</i>	134
E1. In vitro πειράματα επί των δράσεων των διαφόρων εκχυλισμάτων των εκχυλισμάτων των δύο φυτών στη βιωσιμότητα των LMS κυττάρων του επίμυ Wistar – Κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων	134
E2. Πειράματα In vivo αναστολής & τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης μέσω επώασης εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> και έγχυσης σε επίμυες Wistar	136
E3. Μελέτη In vivo των αντικαρκινικών δράσεων των εκχυλισμάτων των <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες που έγιναν καρκινοπαθείς μέσω ενοφθαλμισμού LMS κυττάρων	139
E4. Μελέτη In vivo της αναστολής της αιματογενούς μεταστατικής διασποράς σε επίμυες Wistar στους οποίους χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως 2×10^6 λειομυοσάρκωματικά κύτταρα – Δράση	

των μικτών εκχυλισμάτων φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i>	142
E5. Μελέτη των αντικαρκινικών δράσεων του μικτού εκχυλίσματος των φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar που έγιναν καρκινοπαθείς μέσω χορήγησης B[a]P	144
E6. Δοκιμή οξείας τοξικότητας του μικτού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i>	145
E7. Δοκιμή χρόνιας τοξικότητας του μικτού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar	146
E8. Πειράματα αναστολής – τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης μέσω χορήγησης υδατικών εκχυλισμάτων <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar	147
E9. Πείραμα θεραπευτικής χορήγησης υδατικού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar που ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους με τη χορήγηση B[a]P υποδορίως	148
E10. Μελέτη κυτταροτοξικών δράσεων ενός λειοφυλιωμένου υδατικού εκχυλίσματος επί της σειράς καρκινικών κυττάρων L-210	148
α) Παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> για χρήση στα ζώα και στα κύτταρα L-210	149
ΣΤ. Δράσεις του μικτού εκχυλίσματος των δυο φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> στη συσσώρευση αιμοπεταλίων ανθρώπου <i>ex vivo</i> και πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού <i>in vitro</i>	150
ΣΤ1. Προπαρασκευή διαλυμάτων για τελική χρήση στο συσσωρευόμετρο	150
ΣΤ2. Πειράματα συσσώρευσης αιμοπεταλίων ανθρώπου	151
α) Δότες και αιμοληψίες	151
β) Παρασκευή των αιμοπεταλίων – Προπαρασκευή (PRP) και (PPP)	152
γ) Περιγραφή του συσσωρευόμετρου και της μεθόδου μελέτης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων <i>ex vivo</i> και <i>in vitro</i>	153
δ) Τυπικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών συσσωρευογραφημάτων	155

ε) Μεταβολές της εικόνας των συσσωρευογραφημάτων κατόπιν της χρήσης αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης	158
στ) Εκτέλεση των πειραμάτων αναστολής των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων	160
ζ) Χρησιμοποιηθείσες συσκευές	162
ΣΤ3. Έλεγχος της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 (TXA ₂) από τα αιμοπετάλια του ανθρώπου μέσω διέγερσης τους με αγωνιστές (ADP, PAF, αραχιδονικό οξύ και λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar	163
α) Εκχύλιση και προσδιορισμός της θρομβοξάνης A_2	164
Z. Δράση του ανασυσταθέντος δια φυσιολογικού ορού αιθανολικού εκχυλίσματος των φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> επί της κυτταροτοξικής ικανότητας του λευκοκυτταρικού υποπληθυσμού των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NKCs) ανθρώπων	166
Z1. Μεθοδολογία των πειραμάτων - Απομόνωση Έλεγχος λειτουργικότητας (κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων)	166
α) Απομόνωση Φυσικών Φονικών Λεμφοκυττάρων από ολικό ανθρώπινο αίμα	167
β) Η καλλιέργεια των Φυσικών Φονικών Λεμφοκυττάρων	168
γ) Έλεγχος της λειτουργικότητας των NKCs	170
H. Κινητική μελέτη της αντίδρασης υπεροξειδωσής του λινολεϊκού οξέος μέσω του ενζύμου 5 – LOX, απουσία και παρουσία αποξηρανθέντος αιθανολικού εκχυλίσματος των φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i>	174
α) Γενικά	174
β) Περιγραφή του πρωτοκόλλου	175
Α. Απαραίτητα αντιδραστήρια	176
Β. Διαδικασία μέτρησης λιποξυγονασικής δραστηριότητας	177
Θ. Μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του φυτικού εκχυλίσματος <i>Abies alba</i> + <i>Viscum album</i>	178

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	181
I. Αποτελέσματα χημικής καρκινογένεσης στις ομάδες ελέγχου	181
II. Αποτελέσματα των <i>in vitro</i> πειραμάτων επί των δράσεων των διάφορων εκχυλισμάτων των δυο φυτών στην βιωσιμότητα των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμυος Wistar – κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων	181
A. Αποτελέσματα <i>in vitro</i> πειραμάτων εκχυλισμάτων ιστών του φυτού <i>Viscum album</i>	181
A1. Δράση εκχυλισμάτων καρπών του <i>Viscum album</i>	181
A2. Δράση εκχυλίσματος βλαστού <i>Viscum album</i>	183
A3. Δράση εκχυλίσματος φύλλου <i>Viscum album</i>	187
B. Αποτελέσματα <i>in vitro</i> πειραμάτων εκχυλισμάτων ιστών του φυτού <i>Abies alba</i>	190
B1. Δράση εκχυλίσματος φύλλου <i>Abies alba</i>	190
B2. Δράση εκχυλίσματος φλοιού <i>Abies alba</i>	194
B3. Δράση εκχυλίσματος ξύλου <i>Abies alba</i>	198
B4. Δράση εκχυλίσματος συνέργιας <i>A. alba</i> + <i>V. Album</i>	200
Γ. Αποτελέσματα <i>in vitro</i> πειραμάτων με μικτά εκχυλίσματα ιστών των φυτών <i>Abies alba</i> + <i>Viscum album</i>	201
Δ1. Δοκιμή χρόνιας τονικότητας του μικτού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar	213
Δ2. Αποτελέσματα πειράματος <i>in vivo</i> αναστολής και τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης μέσω επώασης εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> και έγχυσης σε επίμυες wistar	222
Δ3. Αποτελέσματα πειράματος δράσης εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> επί καρκινοπαθών επιμύων Wistar που ανέπτυξαν όγκους με ενοφθαλμισμό νεοπλασματικών κυττάρων συγγενούς επίμυος	225
Δ4. Αποτελέσματα της <i>in vivo</i> μελέτης της αναστολής της αιματογενούς μεταστατικής διασποράς σε επίμυες Wistar στους οποίους χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως 2×10^6 LMS κύτταρα – δράση των μικτών εκχυλισμάτων <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i>	229

Δ5. Αποτελέσματα πειραμάτων αναστολής – τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης μέσω χορήγησης υδατικών εκχυλισμάτων <i>V. album</i> + <i>A. alba</i> σε επίμυες Wistar	231
Δ6. Αποτελέσματα πειράματος θεραπευτικής χορήγησης υδατικού εκχυλίσματος <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar που ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους με τη χορήγηση B[a]P υποδορίως	238
Δ7. Αποτελέσματα μελέτης των αντικαρκινικών δράσεων του μικτού εκχυλίσματος των φυτών <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i> σε επίμυες Wistar που κατέστησαν καρκινοπαθείς μέσω χορήγησης B[a]P	238
E1. Αποτελέσματα των δράσεων του εκχυλίσματος των φυτών <i>V. album</i> + <i>A. alba</i> στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων	240
1) Λειτουργικές απαντήσεις των αιμοπεταλίων σε σχέση με το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών	240
E2. Αποτελέσματα της αναστολής της 5-λιποξυγονάσης	248
E3. Αποτελέσματα της δράσης του ανασυσταθέντος δια ύδατος αιθανολικού μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών <i>V. album</i> + <i>Abies alba</i> επί της κυτταροτοξικής ικανότητας του λευκοκυτταρικού υποπληθυσμού των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NKCs) ανθρώπων	252
ΣΤ. Αποτελέσματα μελέτης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του φυτικού εκχυλίσματος <i>A. alba</i> + <i>V. Album</i>	257
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	259
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	301
SUMMARY	305
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	309
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	357
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ : ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ WISTAR	373
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ : ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΦΥΤΩΝ <i>Viscum album</i> + <i>Abies alba</i>	383

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΕΡΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ι. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο καρκίνος ορίζεται ως μια παθολογία η οποία έχει ως βάση τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων του σώματος, ο οποίος φαίνεται ότι είναι απότοκος συγκεκριμένων και μόνιμων βλαβών του γενετικού υλικού (καρκινική εξαλλαγή). Ο συνεχής κυτταρικός πολλαπλασιασμός συνοδεύεται και από μια σειρά σημαντικών μορφολογικών και λειτουργικών μεταβολών οι οποίες αλλοιώνουν την συνολική λειτουργία του μεταλλαγμένου κυττάρου, το αναγκάζουν να διηθεί καταστροφικά τους ιστούς και να μεταναστεύει μετατρέποντάς το σε μια παρασιτική οντότητα, που αν κατορθώσει να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί σε μεγάλους αριθμούς δίνει γένεση στην συστηματική νεοπλασματική νόσο η οποία είναι μοιραία για τον οργανισμό τον οποίο έχει προσβάλλει.

Μερικές από τις μεταβολές που χαρακτηρίζουν όλα τα είδη των καρκινικών κυττάρων είναι οι εξής:

1^ο) Παρουσιάζουν ατέρμονο πολλαπλασιασμό σε αντίθεση με κάθε φυσιολογικό κύτταρο του οργανισμού το οποίο παρουσιάζει περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων και τελικά πεθαίνει. Ο περιορισμένος αριθμός διαιρέσεων των φυσιολογικών κυττάρων είναι αυτός που καθορίζει και το πεπερασμένο διάστημα επιβίωσης όλων των έμβιων πολυκύτταρων ζωικών οργανισμών ακόμη και σε συνθήκες ιδανικής διαβίωσης. Φαίνεται ότι ο περιορισμός της πολλαπλασιαστικής ικανότητας σχετίζεται στενά με το μήκος των τελομερών των χρωματοσωμάτων των κυττάρων και την αδυναμία των φυσιολογικών κυττάρων να επιμηκύνουν τα όλο και σμικρυνόμενα κατά την διάρκεια κάθε κυτταρικής αναπαραγωγής τελομερή τους, όπως θα αναπτύξουμε κατωτέρω.

Συνεπώς τα φυσιολογικά κύτταρα δεν είναι σε θέση να διατηρήσουν το μήκος των τελομερών τους σταθερό, οπότε αναγκαστικά κάποια στιγμή θα αρχίσουν να χάνουν γενετικό υλικό οδηγούμενα στο θάνατο, μέσω ενός γενετικού προγραμματισμού. Αντιθέτως τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιμηκύνουν τα τελομερή τους και συνεπώς έχουν το περιθώριο να υφίστανται απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων.

Υπό την έννοια αυτή τα καρκινικά κύτταρα είναι αθανатоποιημένα όσον αφορά τις πολλαπλασιαστικές τους δυνατότητες. Η ιδιότητα αυτή των καρκινικών κυττάρων δεν επαρκεί για να ερμηνεύσει τον διαρκή τους πολλαπλασιασμό, καθόσον υπάρχουν αθανатоποιημένα κύτταρα τα οποία δεν είναι καρκινικά. Χρειάζεται και μια εσωτερική αστάθεια που αναγκάζει το κύτταρο να πραγματοποιεί διαρκώς σύνθεση του DNA και να οδηγείται διαρκώς σε μιτώσεις μη υφιστάμενο τις δράσεις των μηχανισμών ανάσχεσης του πολλαπλασιασμού που υπάρχουν σε κάθε φυσιολογικό κύτταρο του οργανισμού. Η απώλεια αυτών των μηχανισμών ανάσχεσης είναι που τελικά κρίνει το πέρασμα ενός κυττάρου από την αθανатоποιημένη στην καρκινική μορφή.

2^{ον}) Εμφανίζουν απώλεια της διαφοροποίησής τους (ατυπία) και συνεπώς παρουσιάζουν εμβρυακά χαρακτηριστικά.

Η απώλεια της διαφοροποίησης μπορεί να είναι πλήρης ή και μερική και συσχετίζεται άμεσα με την μετάλλαξη την οποία έχουν υποστεί. Κατά κανόνα όσο περισσότερο αδιαφοροποίητο είναι ένα καρκινικό κύτταρο τόσο μεγαλύτερος είναι ο πολλαπλασιαστικός του ρυθμός, όπως επίσης και η δυνατότητα διάβρωσης των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών, πράγμα το οποίο έχει σημαντικές συνέπειες στην επιβάρυνση της νόσου.

3^{ον}) Έχουν απωλέσει την ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού τους λόγω επαφής με τα παρακείμενα φυσιολογικά κύτταρα.

Ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, όταν δημιουργηθεί, λόγω καταστροφής γειτονικών κυττάρων, ένα κενό στον ιστό στον οποίο ευρίσκονται ενταγμένα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια αποκατάσταση των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του τραυματισθέντος ιστού και σταματούν τον πολλαπλασιασμό τους μόλις

έλθουν σε στενή επαφή με τα άλλα κύτταρα του εν λόγω ιστού, στα καρκινικά κύτταρα δεν παρατηρείται το φαινόμενο αυτό: Τα καρκινικά κύτταρα δεν είναι σε θέση να «αισθανθούν» την ύπαρξη της επαφής με άλλα κύτταρα, ως μη δεχόμενα το μήνυμα της παρουσίας άλλων κυττάρων και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ατέρμονα με αποτέλεσμα την δομική παραμόρφωση του ιστού, στον οποίο ανήκουν και τελικά την ρήξη του και την καταστροφή των δομών και λειτουργιών του.

Η ιδιότητα αυτή των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται στενά με την προαναφερθείσα 1^η ιδιότητα του ατέρμονου πολλαπλασιασμού και υποδεικνύει ότι η αναστολή μέσω συνεπαφής δεν είναι σε θέση να προκαλέσει την ανάσχεση του. Αυτό συμβαίνει καθόσον το ενδοκυττάριο σύστημα αναστολής του πολλαπλασιασμού δεν λειτουργεί και συνεπώς τα μηνύματα τα οποία προκύπτουν από την κυτταρική συνεπαφή δεν είναι αναποτελεσματικά λόγω απώλειας του μηχανισμού που εκτελεί τα μηνύματά τους.

4^ο) Ικανότητα μετάστασης:

Τα καρκινικά κύτταρα, πέραν του ατέρμονου πολλαπλασιασμού τους, παρουσιάζουν ταυτοχρόνως και μια ικανότητα μετανάστευσης τόσο σε γειτνιάζοντες, προς το σημείο της αρχικής τους αποικίας ιστούς, όσο και σε ιστούς οι οποίοι ευρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από το σημείο της εν λόγω αποικίας. Η ικανότητα της μετάστασης αποτελεί και την θεμελιώδη ειδοποιοί διαφορά μεταξύ των καλοηθών και κακοηθών όγκων, καθόσον τα κύτταρα των καλοηθών όγκων δεν μεθίστανται, ενώ εκείνα των κακοηθών χορηγούν μεταστάσεις. Η διαδικασία της μεταστατικοποίησης είναι εκείνη η οποία επιτρέπει στον καρκίνο να μετατραπεί τυπικά από εντοπιζόμενη σε συστηματική νόσο.

Επίσης η μεταστατική διασπορά αποτελεί την βασική αιτία η οποία μετατρέπει τον καρκίνο σε νόσο θανατηφόρο, καθόσον με τον τρόπο αυτό η νόσος μπορεί να διασπαρθεί οπουδήποτε σε όλο τον οργανισμό και να καταστρέψει κάθε όργανο στο οποίο θα σχηματίζει αποικίες. Η μεταστατική διασπορά επίσης είναι εκείνη η ιδιότητα η οποία επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να ακολουθήσουν ένα μοντέλο εκθετικής ανάπτυξης, μέχρι κατάρρευσης του οργανισμού από τις συνέπειες των πολλαπλών δομικών και

λειτουργικών καταστροφών καθώς και την τροφική και τοξική πίεση την οποία ασκούν οι καρκινικές αποικίες στο σύνολο του οργανισμού. Η μεταστατική διασπορά φαίνεται να σχετίζεται με τις εξής παραμέτρους:

1^{ον}) με την αδυναμία των καρκινικών κυττάρων να αγκυροβολούν σταθερά μέσα στον ιστό στον οποίο ευρίσκονται, λόγω ανωμαλιών στην έκφραση των λεγόμενων μορίων προσκόλλησης που καθιστά δυνατή την σταθεροποίηση των δεσμών κυττάρου προς κύτταρο και κυττάρου προς την θεμέλια ουσία.

2^{ον}) Με την διαρκή εξωκυττάρωση λυσοσωμιακών ενζύμων (μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας), οι οποίες διαβρώνουν διαρκώς την θεμέλια ουσία στην οποία ευρίσκονται αγκυροβολημένα τα κύτταρα, με αποτέλεσμα την διάβρωση των αγγείων και την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στην αιματική κυκλοφορία και την μεταφορά τους οπουδήποτε μέσα στο σώμα.

3^{ον}) Με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και να δημιουργούν ποικίλου μεγέθους θρόμβους ικανούς να σταματήσουν στο δίκτυο των τριχοειδών με την πιθανότητα να οδηγήσουν σε μια μεταστατική αποικία.

5^{ον}) Διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση:

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να διαφεύγουν, κατά κανόνα, από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος (1). Η πρώτη από τις παραμέτρους που φαίνονται να κυριαρχούν στον γένεση αυτής της αδυναμίας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα είναι το γεγονός ότι το Μέγιστο Σύμπλοκο Ιστοσυμβατότητας που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα δεν διαφέρει από το αντίστοιχο των φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού (1, 2, 3, 5, 8, 10, 14). Με την έννοια αυτή τα κακοήθη κύτταρα δεν είναι, κατά κανόνα, εύκολο να εμφανίσουν αντιγονικότητα και συνεπώς να ερεθίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον αυτών (1, 2, 3). Γίνονται προσπάθειες να αυξηθεί η αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων και έτσι να δημιουργήσουμε εμβόλια κατά του καρκίνου (3, 4, 5, 18, 19, 20, 21). Η δεύτερη πολύ σημαντική παράμετρος που εμποδίζει το ανοσοποιητικό σύστημα να καταστρέψει τα νεοπλασματικά κύτταρα, οφείλεται, κατά τα φαινόμενα, σε μια αδυναμία ενός υποπληθυσμού λεμφοκυττάρων – των λεγόμενων Φυσικών Φονέων -

εξειδικευμένου στην εξόντωση κακοηθών κυττάρων με απλή επαφή να πραγματοποιήσει την επίθεσή του στα καρκινικά κύτταρα – στόχους και να τα εξολοθρεύσει (1, 6, 17). Οι άνθρωποι που εμφανίζουν ανοσοκαταστολή είναι ευάλωτοι στην ανάπτυξη κακοήθους νεοπλασματος (3, 13). Μια από τις πλέον σημαντικές και αρνητικές παρενέργειες των χρησιμοποιούμενων αντικαρκινικών θεραπειών των βασιζόμενων στα κλασσικά κυτταροστατικά φάρμακα και στην χορήγηση ραδιενεργών ακτινοβολιών, αντιπροσωπεύεται από την μεγάλη ανοσοκαταστολή που αυτές οι μέθοδοι προκαλούν (3, 6). Η ανοσοκαταστολή αυτή, καθόσον και η διαλεύκανση του ανασταλτικού ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος στην ανάπτυξη των καρκινικών αποικιών έχει εγείρει μια πολύ μεγάλη συζήτηση μεταξύ των ερευνητών που ασχολούνται με την θεραπεία του καρκίνου (10, 21). Από την άλλη πλευρά ένα μεγάλο μέρος της αντικαρκινικής έρευνας έχει από πολύ καιρό στραφεί προς την γενική και ειδική ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος προκειμένου αυτό να καταστείλει την κακοήθη νεοπλασματική ανάπτυξη (3, 4, 5, 6, 7, 15). Υπάρχουν σήμερα μέθοδοι οι οποίες ισχυροποιούν και διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον των καρκινικών κυττάρων (3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Οι μέθοδοι αυτές φαίνεται, εκ προοιμίου να έρχονται σε ρήξη με τις κλασσικές χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπείες του καρκίνου, χωρίς να διαφαίνεται, μέχρι στιγμής, ένα πεδίο λογικού και λειτουργικού συμβιβασμού. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι μερικές τυπικές χημειοθεραπείες μπορούν να συνυπάρξουν ταυτοχρόνως με θεραπείες οι οποίες προστατεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα από την δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (2, 3, 4, 11, 12, 15). Τα δεδομένα αυτά θα αναπτυχθούν στα παρακάτω κεφάλαια.

6^ο) Διαφορές στον Ενεργειακό Μεταβολισμό:

Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν, κατά κανόνα, αξιόλογες διαφορές στον ενεργειακό τους μεταβολισμό σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, οι δύο μεγάλες μεταβολικές οδοί που εξασφαλίζουν την παραγωγή ενέργειας στα φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα αντιπροσωπεύονται από την γλυκόλυση και την αναπνοή (22). Οι δύο αυτές διεργασίες εδράζονται σε διαφορετικές ενδοκυττάρια δομές και συγκεκριμένα η μεν γλυκόλυση ευρίσκεται τοποθετημένη στο κυτταρόπλασμα, ενώ η

αναπνοή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (22). Από μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν αρχικώς από τον Otto Warburg, την δεκαετία του '30 εδείχθη ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη γλυκόλυση, ενώ από την άλλη πλευρά η λειτουργικότητα της αναπνοής φαίνεται ελαττωμένη (31, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44). Η χρήση μεταβολικών δηλητηρίων που αναστέλλουν την γλυκολυτική διεργασία σε συγκεκριμένα ενζυμικά της βήματα εμποδίζοντας την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα ταχέως στο θάνατο (23, 25, 29, 44). Αυτό το δεδομένο υποδεικνύει ότι τα καρκινικά κύτταρα στηρίζουν την προσπύριση της ενέργειάς τους κατά κύριο λόγο στην γλυκολυτική αλυσίδα κι όχι στην μιτοχονδριακή αναπνοή, πράγμα το οποίο, από την πλευρά της ενεργειακής οικονομίας, είναι ασύμφορο υπό την έννοια ότι η γλυκολυτική αλυσίδα περιλαμβάνει διαδικασίες πολύ μικρής απόδοσης ως προς την παραγωγή της ATP εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες του μιτοχονδρίου (22, 24, 28, 29). Πολύ χαρακτηριστικά όταν ένα μόριο γλυκόζης μεταβολίζεται στην γλυκολυτική οδό αποδίδει μόνον δύο μόρια ATP, ενώ όταν ένα μόριο γλυκόζης μεταβολίζεται στο σύνολο της γλυκολυτικής οδού και της μιτοχονδριακής αναπνοής αποδίδει 36 μόρια ATP. Συνεπώς ο λόγος των αποδόσεων αναπνοής / γλυκόλυση είναι ίσος προς 18, πράγμα που δηλώνει ότι η αναπνευστική παραγωγή ATP είναι 18 φορές μεγαλύτερη από την γλυκολυτική τοιαύτη, όταν ως μεταβολικό καύσιμο χρησιμοποιείται η γλυκόζη. Το ότι το μιτοχόνδριο και κατά συνέπεια η αναπνοή, δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργειακή παραγωγή των καρκινικών κυττάρων αποδεικνύεται με τρόπο κραυγαλέο από το γεγονός ότι η προσθήκη κυανιούχων στο καλλιεργητικό υγρό καρκινικών κυττάρων δεν φονεύουν αυτά, ακόμη και σε συγκεντρώσεις κατά πολύ υψηλότερες από αυτές που εξολοθρεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού (29, 30). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων είτε δεν είναι λειτουργικά, είτε έχει χαθεί η σχέση που τα συζευγνύει με την γλυκολυτική οδό (24, 27, 29, 30). Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί υποδεικνύουν ότι στα καρκινικά κύτταρα δεν λαμβάνει χώρα το φαινόμενο Crabtree, το οποίο κυβερνά την εναλλαγή του ενεργειακού μεταβολισμού από το μιτοχονδριακό στο γλυκολυτικό σκέλος και τανάπαλιν (23, 24, 28, 29, 30). Δεν υπάρχουν πληροφορίες αν τα μιτοχόνδρια είναι λειτουργικά στα καρκινικά κύτταρα και επίσης δεν υπάρχουν επαρκείς

πληροφορίες κατά το πόσον διάφοροι αποσυζευκτές της ροής των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων από την οξειδωτική φωσφορυλλίωση ελαττώνουν την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων.

Στο σημείο αυτό ίσως είναι καλό να προσθέσουμε ότι ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (η περίφημη απόπτωση) σχετίζεται στενά με την μιτοχονδριακή λειτουργία και ενδεχομένως η όλη δυσπραγία στην παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια του καρκινικού κυττάρου ενδεχομένως εκφράζουν μια σχέση μεταξύ αυτών των φαινομένων (24, 27, 28, 30, 33, 34, 36, 38). Δηλαδή η αδυναμία των καρκινικών μιτοχονδρίων να παράγουν με οξειδωτικό μηχανισμό ενέργεια πιθανόν να σχετίζεται με την αδυναμία των ίδιων οργανιδίων να ενεργοποιήσουν τον αποπτωτικό μηχανισμό. Είναι φανερό ότι η παρατήρηση αυτή θέτει την ανάγκη μιας στροφής της έρευνας στην αποσαφήνιση των πιθανών σχέσεων μεταξύ της μιτοχονδριακής δυσπραγίας στην παραγωγή ATP και της μιτοχονδριακής αδυναμίας να πυροδοτήσει τον αποπτωτικό μηχανισμό (26, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 38). Προεκτείνοντας λίγο περισσότερο τους συλλογισμούς μας πάντοτε στο πεδίο του καρκινικού ενεργειακού μεταβολισμού πρέπει να παρατηρήσουμε ότι στον φυσιολογικό οργανισμό η αναερόβια γλυκόλυση και η αερόβια παραγωγή ενέργειας τρέχουν παράλληλα. Ειδικότερα στην βαριά μυϊκή εργασία όταν το επίπεδο της προσπάθειας αυξάνεται, παράλληλα αυξάνεται τόσο η γλυκόλυση όσο και η αναπνοή. Όταν ο οξειδωτικός μηχανισμός ενεργειακής παραγωγής κορεστεί, τότε η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που παράγεται ως τελικό προϊόν της αναερόβιας γλυκόλυσης αρχίζει να λαμβάνει εκθετική πορεία με αποτέλεσμα κάποια στιγμή την οξέωση του οργανισμού και την διακοπή της προσπάθειας λόγω καμάρου. Επίσης κατά τα τελευταία στάδια της νεοπλασματικής νόσου παρατηρείται μια πολύ μεγάλη αύξηση των επιπέδων του κυκλοφορούντος γαλακτικού οξέος στο αίμα των ασθενών (29, 38). Μια αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων γαλακτικού οξέος παρατηρείται στους ασθενείς που πάσχουν από σηψαιμία τελικού σταδίου (38). Στην σηψαιμία αν και το οξυγόνο του αίματος μπορεί να εμφανίζει φυσιολογικές τιμές εν τούτοις τα μιτοχόνδρια των σηπτικών ασθενών δεν φαίνεται να είναι λειτουργικά καθώς δεν καταναλίσκουν το προσφερόμενο οξυγόνο. Ενδεχομένως ο εμποδισμός

αυτής της κατανάλωσης να οφείλεται σε δηλητηρίαση των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας από ρίζες μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]), το οποίο θα μπορούσε να σχηματίσει μια ένωση υψηλής σταθερότητας με τα άτομα σιδήρου των κυτοχρωμάτων, ανάλογη με την σταθερότητα των ενώσεων κυανίου - σιδήρου.

Από την άλλη πλευρά έχει ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μια σειρά νέων φαρμάκων που αναστέλλουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (αλκυλιωμένα παράγωγα αργινίνης) χρησιμοποιούνται κλινικώς με επιτυχία τόσο για την αντιμετώπιση της σηψαιμίας, όσο και του καρκίνου, αν και οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των είναι διαφορετικοί και στις δύο περιπτώσεις (45, 46, 47). Είναι πιθανόν η δυσπραγία των καρκινικών μιτοχονδρίων να οφείλεται σε μια υπερβολική παραγωγή NO[•], το οποίο αναστέλλει την μιτοχονδριακή λειτουργία. Αν υφίσταται το εν λόγω φαινόμενο τότε είναι πιθανόν οι δράσεις των αναστολέων παραγωγής πολυαμινών να μην οφείλονται μόνον στην μείωση του επιπέδου των πολυαμινών – που είναι απαραίτητες για την προστασία των διαρκώς συντιθέμενων DNA – αλλά και στην επανενεργοποίηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, και συνεπώς στην επαναφορά σε λειτουργία της απόπτωσης μέσω μιτοχονδριακού μηχανισμού (45, 46, 47, 48). Η μελέτη των σχέσεων μεταξύ του ενεργειακού μεταβολισμού του καρκινικού κυττάρου και της λειτουργίας της συνθετάσης του νιτροξειδίου είναι ένας καινούργιος κλάδος έρευνας που υπόσχεται πολλά στην προσπάθεια ελέγχου του καρκίνου (45, 46, 47, 48, 49).

7. Διαφορές στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος:

Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν κάποιες ανωμαλίες στον μεταβολισμό του Αραχιδονικού Οξέος (ΑΡΟΞ). Το δεδομένο αυτό συνάγεται από έναν αξιόλογο αριθμό μελετών, οι οποίες άρχισαν να λαμβάνουν χώρα τις αρχές της δεκαετίας του '70 και συνεχίζονται έως σήμερα (50, 51, 52, 53). Το γεγονός ότι η κορτιζόνη και τα διάφορα παράγωγά της που αποκόπτουν τον αραχιδονικό μεταβολισμό τόσο στο επίπεδο της έναρξής του (φωσφολιπάση A2) όσο και σε άλλα ενζυμικά του βήματα, είναι σε θέση να οδηγήσουν τα καρκινικά κύτταρα στον θάνατο, υποδηλώνει ότι ο αραχιδονικός μεταβολισμός αποτελεί ένα ευαίσθητο σημείο τους. Υπάρχουν

πολλές μελέτες οι οποίες υποδεικνύουν ότι πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μεγάλο τόξο ιστολογικών τύπων νεοπλασμάτων, είναι ευαίσθητες και οδηγούνται τόσο σε επιβράδυνση του πολλαπλασιαστικού τους ρυθμού *in vitro*, όσο και σε θάνατο μέσω της χορήγησης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγόντων (74, 75, 76, 77). Ίσως το πλέον αξιοσημείωτο δεδομένο, που συναντάται στην σχετική βιβλιογραφία, είναι ότι οι εν λόγω ουσίες εμφανίζουν πολύ συχνά και αξιόλογες αντιμεταστατικές ικανότητες (78, 79, 80, 81, 82).

Δεδομένου ότι το βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, το οποίο συνάμα προσδιορίζει και το *exitus* του πάσχοντος οργανισμού, είναι η μετάσταση, αντιλαμβάνεται κανείς ότι η δυνατότητα αναχαίτισης των μεταστάσεων αποτελεί και την *contitio sine qua non* μιας ριζικής αντικαρκινικής θεραπείας. Στο σημείο αυτό πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι η μεταστατική διεργασία φαίνεται ότι αποτελεί μια αναπόδραστη κατάσταση η οποία είναι αυτόματη έκφραση της συνολικής βασικής διαταραχής που χαρακτηρίζει το καρκινικό κύτταρο και όχι ένα απλό επιφαινόμενο. Η δήλωση αυτή σημαίνει ότι η μετάσταση είναι ένα γεγονός αναγκαστικό, πού θα προκύψει με αυτόματο τρόπο εξ αιτίας του γεγονότος ότι ένα κύτταρο είναι καρκινικό. Είναι πιθανόν ότι η διαταραχή του αραχιδονικού μεταβολισμού αποτελεί την ενοποιούσα αιτία που οδηγεί το καρκινικό κύτταρο τόσο στον ατέρμονο πολλαπλασιασμό όσο και στην μεταστατική διαδικασία.

Οι απόψεις αυτές θα αναλυθούν διεξοδικά στο σχετικό κεφάλαιο στο οποίο αναλύεται η συμμετοχή του αραχιδονικού μεταβολισμού στην όλη παθοφυσιολογία του καρκίνου. Επί τροχάδην αξίζει να αναφέρουμε, εν είδει προοιμίου, ότι ο διαταραχθείς αραχιδονικός μεταβολισμός φαίνεται ότι επηρεάζει *en bloc*: **1^{ov}**) τον ενεργειακό μεταβολισμό του καρκινικού κύτταρου, **2^{ov}**) την απελευθέρωση λυσοσωμιακών ενζύμων, που πέπτουν την θεμέλια ουσία, **3^{ov}**) την νεοαγγειογένεση και **4^{ov}**) την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλούν την ενσφήνωση θρόμβων με καρκινικά κύτταρα στην τριχοειδή κυκλοφορία και συνακόλουθα την εγκατάσταση αυτών σε απομακρυσμένα από την πρωτοπαθή εστία σημεία δίνοντας γένεση σε μια δευτεροπαθή μεταστατική αποικία (78, 79, 80, 81, 82, 83, 84). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η συνολική εξομάλυνση του αραχιδονικού μεταβολισμού στο καρκινικό κύτταρο ή ακόμη περισσότερο η στοχευμένη

αναστολή του πρέπει να αποτελεί έναν θεμελιώδη στόχο της συνολικής θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ήδη υπάρχουν στην θεραπευτική φαρέτρα σκευάσματα τα οποία λειτουργούν ως εκλεκτικοί αναστολείς διαφόρων κρίσιμων ενζύμων της οδού του αραχιδονικού οξέος, όπως της κυκλοξυγονάσης 2 και των διαφόρων λιποξυγονασών (56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 67). Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία τόσο φυσικών όσο και συνθετικών αντιοξειδωτικών παραγόντων οι οποίοι είναι σε θέση αν όχι να αναστέλλουν τουλάχιστον να επιβραδύνουν κατά πολύ την ενεργότητα της αραχιδονικής οδού με προφανή θετικά αποτελέσματα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού και της μετάστασης τόσο σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα καρκίνου, όσο και σε καρκινοπαθείς ανθρώπους (54, 55, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73).

8. Ύπαρξη γενετικών βλαβών

Ο καρκινικός φαινότυπος είναι ένα φαινόμενο επιγενετικό, (παρά τις περιπτώσεις όπου εμφανίζεται ως καθαρά γενετικό φαινόμενο), καθόσον συνιστά αποτέλεσμα βλαβών στο DNA οι οποίες δεν κατόρθωσαν να διορθωθούν από τα ενδοκυττάρια συστήματα επιδιόρθωσης αυτού και μονιμοποιήθηκαν (γενετική εξαλλαγή), με αποτέλεσμα να μεταφέρονται από μια κυτταρική γενιά σε μια επόμενη μέσω του πολλαπλασιασμού, δίνοντας έτσι τον αρχικό πληθυσμό μετασχηματισμένων γενετικά κυττάρων, που θα εξελιχθούν στο μέλλον σε κακοήγη όγκο και θα αναπτύξουν ενδεχομένως την νεοπλασματική νόσο σε όλα τα υποκλινικά και κλινικά της στάδια. Οι γενετικές αυτές βλάβες δεν είναι οποιεσδήποτε αλλά καθώς φαίνεται αφορούν σαφώς προσδιορισμένα στοιχεία του γενετικού προγράμματος των κυττάρων τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δηλαδή οι καρκινογόνες μεταλλάξεις φαίνεται ότι καταργούν ή δυσχεραίνουν το σύστημα των ελέγχων του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που τις έχουν υποστεί. Η γενετική μελέτη του καρκίνου που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία τριάντα χρόνια είναι πολύ βαθιά και μας έχει προσπορίσει ένα πολύ μεγάλο αριθμό πληροφοριών που μας βοηθά να κατανοήσουμε τους αυτοματισμούς που διέπουν τον ατέρμονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 97, 98, 100, 110, 111, 113, 120).

Γενικά ο καρκίνος φαίνεται να εμφανίζει σε έναν βαθμό μια κληρονομικότητα, πράγμα το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου γενετικού υποστρώματος επί του οποίου βασίζεται ο φαινότυπος των κακοηθών νεοπλασματικών κυττάρων (89, 93, 94, 97, 98, 120). Έτσι φαίνεται ότι αρκετοί κακοήθεις όγκοι του πεπτικού συστήματος, με ιδιαίτερη επικέντρωση στο παχύ έντερο, εμφανίζουν σαφή στοιχεία κληρονομικότητας (123, 124, 125, 126, 127, 128, 129). Αντίστοιχα δεδομένα ισχύουν και για μερικούς τύπους λευχαιμιών σε μια από τις οποίες ένα συγκεκριμένο χρωμόσωμα (Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια), εμφανίζει ένα σταθερό μορφολογικό στοιχείο το οποίο φαίνεται να εγκλείει συστοιχίες γονιδίων με μεταλλαγμένα χαρακτηριστικά, η ανάλυση της λειτουργίας των οποίων μπορεί να προσφέρει πολύ ισχυρές και ρεαλιστικές βάσεις για μια ορθολογική και αιτιολογική θεραπεία του αντίστοιχου είδους καρκίνου, αλλά και άλλων μορφών αυτού στο βαθμό που τα εν λόγω στοιχεία είναι γενικεύσιμα (89, 101, 112, 114, 115, 119).

Γενικά οι οικογένειες στους προπάτορες των οποίων έχουν σημειωθεί κρούσματα καρκίνου, εμφανίζουν μεγαλύτερες συχνότητες της νόσου αυτής και στους απογόνους. Φυσικά ο καρκίνος είναι μια νόσος πολυπαραγοντική και προφανώς η ύπαρξη ενός προδιαθέτοντος γενετικού υποστρώματος δεν σημαίνει την *de facto* αναπαραγωγή της νόσου στην γενετική σειρά των οικογενειών που είναι φορείς του εν λόγω υποστρώματος. Πάρα πολλά δεδομένα προερχόμενα από τα πειράματα χημικής καρκινογένεσης που ξεκίνησαν περί το 1920 από ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες και συνεχίστηκαν μέχρι των ημερών μας, αποδεικνύουν την στενότητα συνάφεια μεταξύ μεταλλαξιγόνων και καρκινογόνων παραγόντων, υπό την έννοια ότι όλα τα χημικά καρκινογόνα είναι μεταλλαξιγόνοι παράγοντες, ενώ πολλές μεταλλαξιγόνες ουσίες είναι σε θέση να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν την δημιουργία καρκίνου (110, 121, 122).

Ένας επίσης επιβλητικός όγκος δεδομένων έχει προκύψει από το σύνολο των μελετών που εστιάζονται στις καρκινογόνες δράσεις της ραδιενέργειας και εν γένει, των ιονιζουσών ακτινοβολιών (102, 117, 118). Δεν είναι τυχαίο ότι πολλοί χημικοί καρκινογόνοι παράγοντες ονομάστηκαν αρχικά και ακτινομιμητικές ουσίες. Έτσι, πολύ συχνά, μετά την εφαρμογή καρκινογόνων ουσιών ή την έκθεση κυττάρων ή οργανισμών σε ραδιενεργό

ακτινοβολία, η κυτταρογενετική ανάλυση δείχνει την ύπαρξη χρωμοσωμιακών ανωμαλιών, όπως θραύσεων, μεταθέσεων τμημάτων χρωμοσωμάτων, απωλειών τμημάτων αυτών, αντιστροφών κ.ο.κ., όπως ακόμη αλλαγών στον αριθμό των χρωματοσωμάτων, και τέλος αλλαγών στο σύνολο αυτών (πολυπλοειδίες) (106, 114, 115, 116).

Ωστόσο τα δεδομένα για την ύπαρξη εξειδικευμένων γονιδίων τα οποία εμπλέκονται με άμεσο τρόπο στην γένεση του καρκίνου και στην περαιτέρω εξέλιξή του αναδύθηκαν, με τρόπο σαφή, από την μελέτη των δράσεων διαφόρων ογκογόνων ιών σε μια ποικιλία πειραματικών μοντέλων (95, 96, 99, 102, 104, 105, 107, 108, 109).

Το γεγονός ότι κάποιοι ιοί έχουν ογκογόνες ιδιότητες καταγράφηκε για πρώτη φορά από τον Roys το 1909 και αποτελεί ένα σκαιό παράδειγμα δογματισμού το γεγονός ότι οι απόψεις του εν λόγω ερευνητή άργησαν σχεδόν πενήντα χρόνια να γίνουν αποδεκτές και να μελετηθούν σε βάθος (103, 104, 105, 107, 108, 109).

Οι καρκινογόνοι παράγοντες επηρεάζουν την δομή του DNA κατά διάφορους τρόπους:

A) Οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες φαίνεται ότι δρουν προκαλώντας:

α) Φαινόμενα ραδιόλυσης του ύδατος και δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου, όπως ριζών $\text{OH}\cdot$, ριζών ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου ($\text{O}^{\cdot-2}$), H_2O_2 και ατομικού οξυγόνου $[\text{O}]$. Τα μόρια αυτά είναι χημικώς πολύ ενεργά και δύνανται να αντιδράσουν με όλα τα ενυπάρχοντα στο κύτταρο βιομόρια και κατά συνέπεια με τις βάσεις του DNA, είτε άμεσα, είτε έμμεσα, μέσω αλυσίδων δημιουργίας ελευθέρων ριζών (130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142).

β) Φαινόμενα ισχυρής διέγερσης των ηλεκτρονικών νεφών των διαφόρων βιομορίων με αποτέλεσμα την απόσπαση ηλεκτρονίων από διάφορα οργανικά μόρια, η οποία οδηγεί στην δημιουργία καρβοκατιόντων, όπως επίσης και ενεργών μορφών οργανικών μορίων που συλλαμβάνουν τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια φορτιζόμενα αρνητικά και αποκτώντας δομή και ιδιότητες ελεύθερης ρίζας.

Όλα αυτά τα ακτινοχημικά φαινόμενα των μοριακών ενεργοποιήσεων, των θραύσεων δεσμών και της δημιουργίας αλυσίδων ελευθέρων ριζών συνυπάρχουν στα φυσιολογικά κύτταρα αμέσως μετά την ακτινοβόλησή τους σε χρόνους ελάχιστους, της τάξεως των μικροδευτερολέπτων, έως χιλιοστών του δευτερολέπτου (139, 140). Αν ωστόσο το δείγμα οργανικής ουσίας που ακτινοβολείται συντηρηθεί κατάλληλα πριν την χορήγηση της ακτινοβολίας, ο αριθμός των ελευθέρων ριζών που αναπτύσσονται στην μάζα του παραμένει επί μακρά χρονικά διαστήματα (π.χ επί 57 και πλέον ημέρες, στην περίπτωση των κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς) (141). Το DNA πλήττεται ταυτοχρόνως σε πολλά σημεία, καθόσον οι δράσεις των ακτινοβολιών φαίνεται να μην παρουσιάζουν ιδιαίτερη εκλεκτικότητα, οπότε, εν δυνάμει, όλα τα γονίδια είναι δυνατόν να υποστούν εκτεταμένες βλάβες (139, 140), των οποίων η συστημική έκφραση είναι η λεγόμενη ακτινική νόσος (ή νόσος εξ ακτινοβολίας) (144, 145). Τα άτομα τα οποία δεν καταλήγουν από τις συνέπειες της ακτινικής νόσου (143) παρουσιάζουν σε πολύ μεγαλύτερη συχνότητα καρκίνο από τον μη εκτεθειμένο πληθυσμό, με προεξάρχοντα τύπο τις λευχαιμίες. Οι απόγονοι των εν λόγω ατόμων επίσης εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά καρκίνου, σε σχέση με τους απογόνους των μη εκτεθειμένων στην ακτινοβολία πληθυσμών. Οι γενετικές ανωμαλίες στα άτομα αυτά είναι πολλών τύπων και αρκετά συχνές, ενώ από την άλλη πλευρά οι κυτταρογενετικές μελέτες δείχνουν και μορφολογικές ανωμαλίες στα χρωματοσώματά τους (130, 133, 134, 136, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145). Συνεπώς η γονιδιοτοξική δράση των ακτινοβολιών είναι πλήρως καταγεγραμμένη και αποδεδειγμένη (130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145).

B) Οι κλασικοί οργανικοί χημικοί καρκινογόνοι παράγοντες, και συγκεκριμένα οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), τα Νιτροδοπαράγωγα, (μεταξύ των οποίων οι νιτροζαμίνες) όπως επίσης και οι αφλατοξίνες (προϊόντα του μύκητα *Aspergillus flavus*), δρουν προκαλώντας σημαντικές βλάβες στο DNA η οποία καταλήγει σε κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων στόχων (146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162). Οι δράσεις των περισσοτέρων εκ των αναφερθέντων ουσιών φαίνεται ότι διαμεσολαβούνται μέσω μηχανισμών

δημιουργίας ελευθέρων ριζών, οι οποίες παράγονται από ενεργοποίηση των εν λόγω μορίων στο μικροσωματικό σύστημα του κυτοχρώμου P-450 ή ακόμη και στα αντίστοιχα κυτοχρωμικά συστήματα των μιτοχονδρίων (163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177). Υπάρχουν μερικά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι, τουλάχιστον στην περίπτωση των ΠΑΥ και ειδικότερα του 3,4 – βενζοπυρενίου (B[a]P), οι τελικοί καρκινογόνοι μεταβολίτες πλήττουν πιο συχνά τις πυριμιδινικές παρά τις πουρινικές βάσεις (170, 171). Το B[a]P είναι πλήρες καρκινογόνο, πράγμα που σημαίνει ότι η καρκινογένεση που προκαλεί λαμβάνει χώρα μέσω ενός σταδίου, το οποίο συμπυκνώνει την φάση τόσο της έναρξης όσο και της προώθησης, όπως θα δούμε αναλυτικότερα κατωτέρω (172), εφ' όσον η ουσία αυτή χρησιμοποιήθηκε και για την πραγματοποίηση των χημικών καρκινογενέσεων οι οποίες αποτέλεσαν τμήμα του πειραματισμού μας.

Εκτός από τα αμιγή καρκινογόνα των οποίων η τελική έκβαση των δράσεών τους είναι πάντοτε ο καρκίνος, υπάρχουν και πάρα πολλές άλλες οργανικές ουσίες οι οποίες έχουν μεταλλαξιογόνες ιδιότητες και εξ αιτίας αυτών είναι σε θέση να προκαλέσουν κακοήγη εξαλλαγή, χωρίς ωστόσο να είναι υποχρεωτικώς στενά καρκινογόνοι, διαφοριζόμενες έτσι από τους μόλις προαναφερθέντες χημικούς παράγοντες. Μερικές από τις ουσίες αυτές είναι διάφορα οργανικά εποξειδία, διάφορα φάρμακα, όπως οι υδραζίνες και οι κλασικοί κυτταροστατικοί παράγοντες (υπερίτες, αντιμεταβολίτες, ανθρακυκλίνες, ταξολοειδή κ.α.), οργανικές ενώσεις αλογόνων (όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια), οργανικές ουσίες περιεχόμενες σε διάφορα τρόφιμα, όπως η γκοσσυπόλη και η σικαζίνη, ερεθιστικές ουσίες, όπως οι εστέρες της μυριστικής φορβόλης που απαντούν στο έλαιο του φυτού Κρότωνα κ.ο.κ. Σχεδόν η πλειονότητα των εν λόγω μεταλλαξιογόνων ουσιών λειτουργούν ως διεγέρτες αντιδράσεων μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ειδικότερα οι εστέρες της μυριστικής φορβόλης εξ αιτίας της ικανότητάς τους να προάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών χρησιμοποιούνται και ως πυροδότες της φλεγμονής σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Πρέπει να σημειώσουμε ότι η βασική πηγή των εστέρων της μυριστικής φορβόλης, δηλαδή το κροτωνέλαιο, χρησιμοποιείτο εμπειρικώς επί δεκαετίες για την πραγματοποίηση της δεύτερης φάσεως της χημικής καρκινογένεσης, δηλαδή της λεγόμενης προαγωγής. Κατόπιν η απομόνωση αυτών των ενεργών του

συστατικών και ο πειραματισμός με λευκοκύτταρα έδειξαν ότι οι εν λόγω εστέρες διέγειραν την παραγωγή ελευθέρων ριζών, καταδεικνύοντας ότι αυτές ήταν υπεύθυνες για την διαστολή και την εμπέδωση της γενετικής βλάβης που είχε ήδη προκαλέσει η χορήγηση της εναρκτικής ουσίας (172, 173, 174, 175, 176, 177).

Γ) Τα μέταλλα με καρκινογόνες ιδιότητες

Πολλά στοιχεία μετάπτωσης, καθώς και βαρέα μέταλλα τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί επιδημιολογικά για την πρόκληση καρκίνου και των οποίων έχει επιβεβαιωθεί στο εργαστήριο τόσο η μεταλλαξιογόνος όσο και η καρκινογόνος δράση τους φαίνεται ότι ενεργούν μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών (178, 179, 180, 185).

Στην περίπτωση των μετάλλων μετάπτωσης φαίνεται ότι ο κύριος μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών αντιπροσωπεύεται κατά κύριο λόγο από αντιδράσεις τύπου Fenton ή αντιδράσεις τύπου Haber- Weiss οι οποίες μπορούν να προκληθούν εκ μέρους μετάλλων μεταπτώσεως παρουσία καταλλήλων ουσιών με οξειδωτικό ή ακόμη και αναγωγικό δυναμικό, όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω (178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186). Τα διάφορα μέταλλα φαίνεται ότι δεν ευρίσκονται σε ελεύθερη κατάσταση μέσα στις δομές του σώματος αλλά συμπλοκοποιούνται με ποικίλες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να σταθεροποιήσουν το σθένος του μετάλλου σε μια τιμή, παρεμποδίζοντας τις κυκλικές μεταβάσεις από υψηλότερα σε χαμηλότερα σθένη και αντιστρόφως, οπότε να το αδρανοποιήσουν και να το οδηγήσουν σε αποβολή. Ωστόσο τα μέταλλα μετάπτωσης είναι δυνατόν να συμπλοκοποιηθούν με αιμικά μόρια, παράγωγα αυτών καθώς και αμινοξέα εισερχόμενα σε διάφορους μεταβολικούς κύκλους με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε οξειδαναγωγικούς καταλύτες που είναι ικανοί να λειτουργήσουν ως οξειδάσες ικανές να ενεργοποιήσουν το οξυγόνο και να το μετατρέψουν σε ελεύθερες ρίζες (168, 187, 188). Πολύ χαρακτηριστικά η προσθήκη αιματοπορφυρίνης σε αιμοπετάλια στα οποία το σύστημα της κυκλοξυγονάσης έχει αποκλειστεί με ασπιρίνη, είναι σε θέση να προσδώσει στην υπάρχουσα λιποξυγονάση δραστηριότητα κυκλοξυγονάσης (168, 187, 188, 189). Έχοντας υπ' όψιν ότι η κυκλοξυγονάση έχει ιδιότητες κυτοχρώμου P-450 μπορεί κανείς να θεωρήσει ότι οι αντιδράσεις ελευθέρων

ριζών που καταλύονται από τα μέταλλα μπορούν εν τέλει να παραβιάσουν το γενετικό υλικό και να προκαλέσουν μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να αποβούν και καρκινογόνες.

Δ) Δράσεις ογκογόνων ιών επί του DNA.

Η μελέτη της καρκινογένεσης που παράγεται από την είσοδο στα κύτταρα μερικών κατηγοριών ιών με ογκογόνες ιδιότητες μας έχει προμηθεύσει πολλά στοιχεία σχετικά με τις εστιακές γενετικές βλάβες που προκαλούν κακοήθη εξαλλαγή. Η συμμετοχή μερικών RNA – ιών στην καρκινογένεση και η γενετική ανάλυση των μεταβολών που προκαλεί η είσοδος του γονιδιώματος των εν λόγω ιών στο γενετικό υλικό του ξενιστή διαμόρφωσε συν το χρόνο την άποψη ότι κάθε φυσιολογικό κύτταρο εμπεριέχει στο DNA του οικογένειες γονιδίων, τα οποία αν αλλοιωθούν, είναι σε θέση να εξαλλάξουν το κύτταρο σε καρκινικό. Τα ούτω μεταλλαγμένα γονίδια ονομάστηκαν ογκογονίδια ενώ τα πρωτεϊνικά τους προϊόντα ονομάστηκαν ογκοπρωτεΐνες.

Οι αρχικές προσεγγίσεις που έλαβαν χώρα προς αυτή την κατεύθυνση μελετών θεώρησαν ότι τα ογκογονίδια δεν ήταν προϋπάρχοντα τμήματα του γενετικού υλικού του κυττάρου – ξενιστή, αλλά είχαν εισαχθεί σε αυτό εκ μέρους του ιού, πιθανόν με μια διαδικασία ανασυνδυασμού του DNA, εξ αιτίας κάποιων αλληλουχιών βάσεων κοινών στο γενετικό υλικό του ιού και στο αντίστοιχο του κυττάρου – ξενιστή. Φυσικά, δεδομένου ότι επρόκειτο περί RNA – ιών έπρεπε προηγουμένως να γίνει μετατροπή του υπό μορφή RNA γονιδιώματος του ιού σε DNA γονιδίωμα, μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης, προκειμένου κατόπιν να είναι δυνατός ο ανασυνδυασμός με κάποια ομόλογη περιοχή του κυτταρικού γονιδιώματος. Συνεπώς αρχικά τα ογκογονίδια θεωρήθηκαν εξωγενή στοιχεία εισαγόμενα στο κύτταρο από άλλον οργανισμό. Επίσης η παρεμβολή τους μέσα στο γονιδιακό υλικό του ανθρώπου θεωρήθηκε ως αιτία μετάλλαξης του καθόσον δημιουργούσε μια διαταραχή στην συνέχεια της αλληλουχίας των βάσεων του κυτταρικού DNA. Ωστόσο σύντομα εδείχθη ότι τα φυσιολογικά κύτταρα περιείχαν γενετικό υλικό στενότατα ομόλογο προς εκείνο των υποτιθέμενων εξωγενών ιικών ογκογονιδίων, η ύπαρξη του οποίου δεν παρήγαγε κανένα από τα φαινόμενα

τα χαρακτηρίζοντα την καρκινική εξαλλαγή. Τα γονίδια αυτά εκλήθησαν πρωτοογκογονίδια.

Η ύπαρξη αυτής της κατάστασης κατέστη αντιληπτή από την εκτίμηση των δεδομένων που προέκυψαν μέσω της πλήρους ταυτοποίησης του γονιδιώματος μερικών ογκογόνων ρετροϊών. Από την ταυτοποίηση αυτή προέκυψε ότι εκείνο το τμήμα του RNA του ογκογόνου ιού που ακριβώς ευθύνεται για την κακοήθεια κατάγεται από γονίδια κυττάρων ξενιστών και εξ αιτίας του γεγονότος ότι ευνοεί την αναπαραγωγή του ιού αποσπάστηκε και ενσωματώθηκε στο γονιδίωμά του.

Συνεπώς οι ρετροϊοί με καρκινογόνες ιδιότητες έχουν αποσπάσει από κύτταρα ξενιστές κάποιες αλληλουχίες βάσεων οι οποίες επιταχύνουν πολλαπλασίως την αναπαραγωγή των ιών, επιταχύνοντας με ίσο ρυθμό την αναπαραγωγή των κυττάρων ξενιστών.

Δεδομένου ότι οι RNA – ιοί είναι, κατά κανόνα, ήπιοι και μετά το πέρας της αναπαραγωγής των δομικών τους στοιχείων και την ολοκλήρωση της κατασκευής του ιικού σωματίου εξέρχονται του κυττάρου ξενιστή χωρίς να προκαλούν την λύση αυτού, είναι φανερό ότι αυτή η στρατηγική μόλυνσης προσδίδει στον ιό που την χρησιμοποιεί μια μεγαλύτερη δυνατότητα αύξησης του πληθυσμού του. Οι ιοί αυτού του είδους ενσωματούμενοι σε κατάλληλα κύτταρα – ξενιστές οδηγούν ταχέως σε οριστική και σταθερή καρκινογένεση. Το αντίστροφο πείραμα, δηλαδή η αφαίρεση του ογκογονιδίου από το ιικό γονιδίωμα είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη ανασχεση της αναπαραγωγής του ιού, πράγμα το οποίο αποδεικνύει με εύγλωττο τρόπο την σημασία που παίζουν τα ενσωματωθέντα στον ιό και αποσπασθέντα από κάποιον ξενιστή ογκογονίδια.

Έχει μεγάλη σημασία να υπογραμμιστεί, στο σημείο αυτό, ότι οι ογκοπρωτεΐνες οι εκφραζόμενες κατά την ιική εισβολή απεδείχθησαν είτε παρόμοιες, με κάποιες φυσιολογικές κυτταρικές πρωτεΐνες.

Επί των ημερών μας γενικώς πιστεύεται ότι ο κύριος μηχανισμός δια του οποίου οι ρετροϊοί προκαλούν την καρκινογένεση συνίσταται στην εξάσκηση ισχυρού ελέγχου, εκ μέρους του ιικού γονιδιώματος, στην έκφραση των πρωτοογκογονιδίων του κυττάρου ξενιστή. Η εγκατάσταση αυτού του ελέγχου φαίνεται να συντελείται μ' ένα από τους ακόλουθους τρόπους:

- 1^{ον}) Θραύση του πρωτοογκογονιδίου μέσω εισαγωγής εντός της αλληλουχίας των βάσεων του ιϊκού γενετικού υλικού και συνακολούθως της πραγματοποίησης μιας ενθετικής μετάλλαξης.
- 2^{ον}) Εισαγωγή του γενετικού υλικού του ιού σε ένα σημείο του DNA ευρισκόμενο σε στενή γειτνίαση με το πρωτοογκογονίδιο και ενίσχυση, μέσω αυτής της παρουσίας, της έκφρασης του πρωτοογκογονιδίου (cis – ενεργοποίηση).
- 3^{ον}) Ρύθμιση της μεταγραφής του πρωτοογκογονιδίου μέσω μιας ιϊκής πρωτεΐνης (Trans – ενεργοποίηση)
- 4^{ον}) Ανταλλαγή μεταξύ του ιϊκού γονιδιώματος και του γονιδιώματος του κυττάρου – ξενιστή με αποτέλεσμα ο έλεγχος του πρωτοογκογονιδίου να εξασκείται πλέον από το ιϊκό γενετικό υλικό.

Εκτός των ρετροϊών, φαίνεται ότι μια αντίστοιχη στρατηγική συμπεριφοράς ισχύει και για την δράση μερικών DNA – ιών, οι οποίοι είναι ισχυρώς καρκινογόνοι . Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι η προέλευση των ογκογόνων ιδιοτήτων τους από την ενσωμάτωση κυτταρικών πρωτοογκογονιδίων δεν έχει αποδειχθεί, τουλάχιστον μέχρι πριν λίγα χρόνια.

Το σχήμα το οποίο περιγράψαμε για τους ογκογόνους ιούς και τα αποτελέσματα των παρεμβολών τους στην λειτουργία των κυτταρικών πρωτοογκογονιδίων, είναι, κατά τα φαινόμενα γενικεύσιμο και για τους υπόλοιπους καρκινογόνους παράγοντες που προαναφέρθηκαν (ακτινοβολία, οργανικά χημικά καρκινογόνα, βαρέα μέταλλα με ιδιότητες μετάπτωσης).

Στην περίπτωση των εν λόγω παραγόντων ο μηχανισμός της καρκινογένεσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, λειτουργεί κατά κύριο λόγο μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών και εν γένει ενεργών μορίων τα οποία πλήττουν το DNA αντιδρώντας με τις πουρινικές και πυριμιδινικές βάσεις του. Μόλις το ενεργό μόριο αντιδράσει με μια βάση (πράγμα που κατά κύριο λόγο γίνεται με τα άτομα αζώτου που ευρίσκονται ενσωματωμένα σ' αυτήν) οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται με την συμπληρωματική απέναντι βάση του άλλου κλώνου του DNA εξασθενούν. Το άμεσο αποτέλεσμα αυτής της εξασθένησης είναι η προεκβολή των μη συζευγμένων πλέον βάσεων προς τα έξω της διπλής έλικας, οπότε στο σημείο αυτό το DNA καθίσταται εύθραυστο. Η απώλεια της σύζευξης και η προεκβολή των βάσεων αποτελεί ένα μήνυμα

ενεργοποίησης των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, τα οποία κινητοποιούνται τοπικά και αφαιρούν την μετασχηματισθείσα βάση, η οποία ευρίσκεται πλέον ενωμένη με τον τελικό καρκινογόνο παράγοντα. Αν η προσβολή από το τελικό μεταλλαξιογόνο μόριο αφορά μόνον την μια από τις συμπληρωματικές βάσεις, τότε τα ένζυμα επιδιόρθωσης, ακολουθώντας τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, είναι σε θέση να αφαιρέσουν την πληγείσα βάση και να την αντικαταστήσουν με μια ίδια, οπότε η βλάβη αναιρείται πλήρως. Αν όμως η προσθήκη του τελικού καρκινογόνου λάβει χώρα ταυτοχρόνως και συμμετρικά σε δύο απέναντι αζωτούχες συμπληρωματικές βάσεις τότε είναι δυνατόν να γίνει ενσωμάτωση δύο βάσεων οι οποίες μπορεί μιν να είναι συμπληρωματικές αλλά διαφορετικές από εκείνες που εξασφαλίζουν την σωστή αλληλουχία του γενετικού υλικού στο συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο.

Στην περίπτωση αυτή έχουμε μια σημειακή μετάλλαξη η οποία είναι σε θέση να προκαλέσει διαφορές στην συμπεριφορά του γονιδίου. Ακόμη μπορεί να έχουμε πλήρη απώλεια των δύο απέναντι βάσεων και επανασύνδεση των δύο κλώνων του DNA με σημειακή απαλοιφή των πληγείσων βάσεων με αποτέλεσμα την αλλαγή πλέον της σημασίας όλων των κωδικονίων που ευρίσκονται ενσωματωμένα στη συγκεκριμένη τοπική αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Στην περίπτωση αυτή έχουμε πλήρη αποδιοργάνωση της τοπικής γενετικής πληροφορίας και την δημιουργία μιας μεταλλάξεως χωρίς νόημα (non sense mutation).

Αν οι καταστροφικές αυτές μεταβολές λάβουν χώρα στην περιοχή ενεργοποίησης της έκφρασης ενός πρωτοογκογονιδίου ή στην περιοχή αναστολής της έκφρασής του συνάγεται το συμπέρασμα ότι το πρωτοογκογονίδιο αυτό αρχίζει πλέον να εκφράζεται ανώμαλα, με πολλαπλάσιο ρυθμό από τον φυσιολογικό, με αποτέλεσμα η μεταγραφή του να λαμβάνει χώρα σε υψηλούς ρυθμούς και να κωδικοποιεί την σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων ογκοπρωτεϊνών οι οποίες, κατόπιν, δρώντας σε πολλούς ενδοκυττάριους στόχους, είναι σε θέση να δώσουν γένεση στον καρκινικό φαινότυπο. Μπορεί ακόμη να συμβεί η μεταλλακτική δράση του τελικού καρκινογόνου να λάβει χώρα στο επίπεδο της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του πρωτοογκογονιδίου που κωδικοποιούν τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της αντίστοιχης ογκοπρωτεΐνης και να οδηγήσουν στην

δημιουργία μιας ογκοπρωτεΐνης με ενεργότητα πολύ υψηλότερη από την φυσιολογική, οπότε το αποτέλεσμα είναι επίσης η δημιουργία του καρκινικού φαινότυπου. Μπορεί ακόμη η μετάλλαξη να οδηγήσει στον αναδιπλασιασμό της γενετικής πληροφορίας του πρωτοογκογονιδίου, οπότε η μεταγραφή να δημιουργεί διπλάσιες ή και πολλαπλάσιες ποσότητες ογκοπρωτεϊνών με αποτέλεσμα τον εκτροχιασμό της φυσιολογικής λειτουργίας τους. Τέλος ο χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός είναι δυνατόν να απελευθερώσει τα πρωτοογκογονίδια από τους ρυθμιστικούς τους ελέγχους.

Όλα τα ανωτέρω φαινόμενα μπορούν να συνεπιφέρουν κακοήγη εξαλλαγή μέσω διαφορετικών οδών με τελικό αποτέλεσμα πάντα την δημιουργία του καρκινικού φαινοτύπου. Οι βασικές πληροφορίες επί των οποίων συνθέσαμε την εικόνα συσχέτισης των ογκογόνων ιών με τα ογκογονίδια και το φαινόμενο του καρκίνου εμπεριέχονται στις κάτωθι βιβλιογραφικές παραπομπές: (190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212).

Ε) Ο πιθανός ρόλος της αραχιδονικής οδού στην καρκινογένεση

Τα φαινόμενα που δεν έχουν ενταχθεί μέχρι στιγμής μέσα στο ενιαίο πλαίσιο της πολύ ισχυρής θεωρίας των ογκογονιδίων, μέσω σαφών και πειραματικώς αποδεδειγμένων μηχανισμών σύνδεσης τους με τις δράσεις των ενεργοποιημένων ογκογονιδίων, φαίνεται να σχετίζονται με την συμπεριφορά του ενεργειακού μεταβολισμού και την συμπεριφορά της αραχιδονικής οδού στο καρκινικό κύτταρο.

Υπάρχουν σαφή δεδομένα ότι το πολυενζυμικό σύστημα του κυτοχρώμου P – 450 περιέχει πρωτεΐνες που μοιάζουν δομικά και λειτουργικά με την κυκλοξυγονάση. Επίσης το σύστημα του κυτοχρώμου P – 450 είναι σε θέση να μεταβολίσει το αραχιδονικό οξύ. Επί πλέον φαίνεται ότι κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των διαφόρων χημικών καρκινογόνων πραγματοποιείται μια ταυτόχρονη κινητοποίηση της οδού του αραχιδονικού οξέος με την συνοδό παραγωγή αραχιδονικών μεταβολιτών. Συνεπώς οι ενζυμικές αντιδράσεις που μετατρέπουν τις καρκινογόνες ουσίες σε τελικούς ενεργούς μεταβολίτες που πλήττουν το DNA τρέχουν παράλληλα με αντιδράσεις της αραχιδονικής οδού, δηλαδή με αντιδράσεις φλεγμονής.

Η ερώτηση που τίθεται είναι η εξής: Οι αντιδράσεις αυτές παίζουν κάποιο ρόλο στην χημική καρκινογένεση; Μήπως λειτουργούν σαν αντιδράσεις οι οποίες μεγεθύνουν τις βλάβες που πραγματοποιεί στο DNA το τελικό καρκινογόνο λειτουργώντας έτσι προαγωγικά ; Μήπως σε τελική ανάλυση μερικοί από τους φυσιολογικούς ενεργοποιητές των πρωτοογκογονιδίων αντιπροσωπεύονται από προστανοειδή μόρια, οπότε τα χημικά καρκινογόνα δρουν τελικά με σημαντική εκλεκτικότητα, ως μόρια που εμφανίζουν δομικές αναλογίες με τα προστανοειδή; Υπό την έννοια αυτή θα ήταν λογικό να αναμέναμε ότι κάποια από τα προϊόντα της αραχιδονικής οδού, όπως π.χ η θρομβοξάνη A_2 θα έπρεπε να αυξάνουν την έκφραση των πρωτοογκογονιδίων, ενώ η αναστολή αυτής θα έπρεπε να μειώνει την έκφρασή τους. Ενδεχομένως ακόμη κάποια άλλα προστανοειδή μόρια, όπως π.χ η προστακυκλίνη (PGI_2) θα μπορούσαν να ελαχιστοποιούν την έκφραση των πρωτοογκογονιδίων, καθόσον παρατηρείται μια εσωτερική εξισορρόπηση των δράσεων της αραχιδονικής οδού μέσω προϊόντων που λειτουργούν προκαλώντας αντίθετα αποτελέσματα στα κύτταρα στόχους.

Πρέπει να σημειώσουμε στο σημείο αυτό ότι μερικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, όπως η ασπιρίνη είναι σε θέση να μειώσουν τα ποσοστά της καρκινογένεσης. Το ίδιο συμβαίνει και με μια μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της χημικής καρκινογένεσης.

Τίθεται επίσης και το αντίστροφο ερώτημα: Τα ενεργοποιημένα πλέον ογκογονίδια μεταβάλλουν την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αραχιδονικά ένζυμα και προς ποια κατεύθυνση; Οι παραγόμενες ογκοπρωτεΐνες μεταβάλλουν την λειτουργία των αραχιδονικών ενζύμων προς όφελος της επιβίωσης του καρκινικού κυττάρου; Αν συμβαίνει μια τέτοια μεταβολή αυτή είναι φαινόμενο επιγενετικό ή και η ίδια είναι αποτέλεσμα ενός καθαρά γενετικού φαινομένου που σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τα αραχιδονικά ένζυμα, καθώς και σε εκείνα που ρυθμίζουν την έκφρασή τους (51, 75, 81, 84, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228).

ΣΤ) Ενεργειακές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Η ανωμαλία που υπάρχει στον ενεργειακό μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να σχετίζεται με μια δυσπραγία των μιτοχονδρίων να παράγουν μεγάλες ποσότητες ATP με αποτέλεσμα το καρκινικό κύτταρο να στρέφεται στην γλυκόλυση για την προσπύριση της ενέργειας που χρειάζεται προκειμένου να επιβιώσει και να αναπαραχθεί.

Για την μεν δράση των ογκογόνων ιών στην μιτοχονδριακή λειτουργία η βιβλιογραφία φαίνεται να είναι πτωχή, οπότε δεν γνωρίζουμε το ισχύον καθεστώς των παρεμβολών των ρετροϊών και των DNA ογκογόνων ιών στο μιτοχονδριακό χρωματόσωμα. Από το πεδίο όμως της χημικής καρκινογένεσης η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι πολλά, αν όχι όλα, εκ των χημικών καρκινογόνων μπορούν να μεταβολιστούν όχι μόνο στο μικροσωμιακό κυτόχρωμα P – 450 αλλά και στα αντίστοιχα συστήματα των μιτοχονδριακών κυτοχρωμάτων. Δεδομένου ότι οι μεταβολίτες των καρκινογόνων είναι, και στην περίπτωση αυτή ενεργά μόρια, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι το πρώτο σύστημα που θίγεται από αυτούς είναι το μιτοχόνδριο αυτό καθαυτό και προφανώς το γενετικό υλικό του.

Άρα είναι μέσα στις θεμιτές υποθέσεις να θεωρήσουμε ότι η δυσπραγία των μιτοχονδρίων των καρκινικών κυττάρων να παράγουν φυσιολογικά ενέργεια πιθανώς οφείλεται σε κάποιες μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στον συνολικό μηχανισμό της παραγωγής ενέργειας ή που συντονίζουν το μιτοχόνδριο με την γλυκολυτική αλυσίδα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι πέραν της ανωμαλίας στην αερόβια ενεργειακή παραγωγή, είναι πιθανόν και η δυσπραγία του μηχανικού της απόπτωσης, από την οποία πάσχει το καρκινικό κύτταρο να είναι μιτοχονδριακής προέλευσης, καθόσον ένα μεγάλο τμήμα του καταρράκτη των αποπτωτικών αντιδράσεων έχει έδρα του το μιτοχόνδριο.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι ο Παράγοντας Νέκρωσης των Ογκων (TNF) φονεύει διάφορους τύπους κυττάρων προκαλώντας αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσορυλίωσης από την ροή των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων του κυττάρου στόχου.

Στις αντιδράσεις του καταρράκτη της απόπτωσης η παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει ένα σημαντικό ρόλο και γνωρίζουμε ότι η αναπνευστική λειτουργία των μιτοχονδρίων έχει σαν παράπλευρα προϊόντα της την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Περίπου το 3% του χρησιμοποιούμενου από το μιτοχόνδριο οξυγόνου μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες. Ενδεχομένως το καρκινικό μιτοχόνδριο δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει το οξυγόνο διότι σε κάποιο βήμα της αναπνευστικής αλυσίδας, ένα μεταλλαγμένο ένζυμο δεν μπορεί να επιτρέψει την φυσιολογική ροή των ηλεκτρονίων, οπότε η όλη διαδικασία διακόπτεται εκεί τόσο για την ενεργό παραγωγή όσο και για την απόπτωση. Οι σκέψεις αυτές αποτελούν έναν προβληματισμό σχετικά με τον προσανατολισμό της αντικαρκινικής έρευνας στο Εργαστήριό μας (23, 27, 28, 42, 229, 230, 231, 232).

II. ΓΕΓΟΝΟΤΑ ΣΥΜΒΑΙΝΟΝΤΑ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΚΑΚΟΗΘΗ ΕΞΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥΣ

Όπως προαναφέραμε η θεμελιοδέστερη εκδήλωση της καρκινικής εξαλλαγής αντιπροσωπεύεται από τον ατέρμονο και επιζήμιο για τον οργανισμό πολλαπλασιασμό των καρκινικών πλέον κυττάρων. Ο φυσιολογικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός στον ώριμο οργανισμό είναι μια λειτουργία η οποία κυβερνάται από μια υψηλή ιεραρχία παραγόντων στην κορυφή της οποίας ευρίσκεται τοποθετημένος, κατά τα φαινόμενα, ο νευρικός ιστός, καθόσον κατά την εμβρυογένεση πρωτίστως σχηματίζονται τα στοιχεία των οργάνων του νευρικού συστήματος τα οποία κατόπιν φαίνεται να υποκινούν και να καθοδηγούν τον σχηματισμό όλων των υπολοίπων ιστών, οργάνων και συστημάτων του σώματος.

Τα γονίδια των κυττάρων των πρώτων εμβρυακών ιστών πρέπει να εκφραστούν με μια αυστηρή συνέχεια προκειμένου να παραχθούν οι σωστές δομές στην σωστή τοπογραφική θέση και να αναπτυχθούν οι σωστές μεταξύ τους σχέσεις προκειμένου το σύνολό τους να συνδεθεί αρμονικά σε ένα ενιαίο και στοχοκινούμενο λειτουργικό σύστημα. Ο συνολικός στόχος είναι η κατασκευή του περιπλοκότατου συστήματος του οργανισμού, το οποίο πρέπει να εμφανίζει πολύ ισχυρή ολοκλήρωση και πρέπει να είναι ικανό να αναπτυχθεί χωρίς εσωτερικές αντιφάσεις και σε πλήρη εσωτερική συμφωνία

προκειμένου να δώσει ένα ον ικανό να επιβιώνει αυτόνομα προσαρμοζόμενο με ταχύτητα και ακρίβεια στις διακυμάνσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος, προκειμένου να διατηρήσει αδιατάρακτη την ομοιοστασία του.

Ο ίδιος κανόνας της Κυβερνητικής που εφαρμόζεται στην δόμηση όλων των οργανωμένων τεχνητών συστημάτων ισχύει και για την δόμηση των έμβιων όντων: Πρώτα κατασκευάζεται ο μηχανισμός κυβέρνησης και εν συνεχεία κατασκευάζονται οι υπόλοιπες δομές. Πρώτα κατασκευάζονται τα Επιτελεία και κατόπιν το υπόλοιπο των Στρατών.

Όσον αφορά την εμβρυογένεση παρατηρείται ότι στην αρχή ξεκινούμε με την πλέον αδιαφοροποίητη μορφή κυττάρων, το ζυγωτό, και εν συνεχεία προχωρούμε σταδιακά στην δημιουργία όλο και περισσότερο διαφοροποιημένων μορφών κυττάρων προκειμένου να προκύψουν όλες εκείνες οι δομές που απαρτίζουν το σύνολο των οργάνων και συστημάτων. Πάντοτε, μέσα στα πλαίσια κάθε διαφοροποιούμενου ιστού παραμένει μια εφεδρεία αδιαφοροποίητων κυττάρων τα οποία χρειάζονται για την αναπλήρωση των κυτταρικών απωλειών του συγκεκριμένου ιστού και για την διαστολή του μεγέθους και των λειτουργιών του, ανάλογα με τις ανάγκες προσαρμογής στην περιβαλλοντική πίεση. Φαίνεται επίσης ότι όσο περισσότερο ένας ιστός διαφοροποιείται τόσο περισσότερο η ταχύτητα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ελαττώνεται προκειμένου να φτάσει σε μια ιδανική τιμή ικανή να εκφράσει την δυναμική ισορροπία μεταξύ φυσιολογικής φθοράς και φυσιολογικής αναπλήρωσης των κυττάρων που υπέκυψαν. Τα μυϊκά και νευρικά κύτταρα που κλασσικά θεωρούνται ως οι υψηλότερα διαφοροποιημένες κυτταρικές δομές του οργανισμού φαίνεται να έχουν παντελώς απωλέσει την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα.

Συνεπώς μπορούμε, κατά κανόνα, να θεωρήσουμε ότι το αναπαραγωγικό δυναμικό ενός κυττάρου είναι συνάρτηση της διαφοροποίησής του. Αυτό φυσικά δεν σημαίνει ότι η διαφοροποίηση δεν διαζευγνύεται από την πολλαπλασιαστική ικανότητα. Φαίνεται ωστόσο ότι ο τύπος της διαφοροποίησης και ο συνακόλουθος ρόλος που αποδίδεται μέσω αυτής στα κύτταρα ενός ιστού προσδιορίζουν το «κεφάλαιο» διαιρέσεων ενός κυττάρου:

Για τα κύτταρα του αίματος και τον επιθηλίων αυτό το κεφάλαιο είναι πολύ μεγάλο, αλλά για το νευρικό ή μυϊκό κύτταρο η φύση επέλεξε η

διαιρετότητα να είναι πλήρως απαγορευμένη, ενδεχομένως εξ αιτίας της δομικής και λειτουργικής αναστάτωσης που θα προκαλούσε μια αυξημένη διαιρετότητα σ' αυτούς τους ιστούς. Φυσικά ο καρκίνος προκαλεί από την φύση του τέτοιου είδους δομικές και λειτουργικές αναστατώσεις διαλύοντας την αρχιτεκτονική του σώματος.

Φαίνεται ακόμη ότι κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ο οργανισμός, σε αρκετές περιπτώσεις παράγει πολύ μεγάλους αριθμούς κυττάρων, προκειμένου να πλάσει τις δομές των ιστών και των οργάνων του με κάποια αφθονία κυτταρικού υλικού. Κατόπιν, καθώς οι ιστοί και τα όργανα εξελίσσονται προς την τελική τους δομή και λειτουργία, τα πλεονάζοντα κύτταρα οδηγούνται μαζικά σε απόπτωση, με σκοπό την αυστηρή περιχαράκωση των δομών στο τελικό τους πρότυπο και μόνον ένας περιορισμένος αριθμός αρχέγονων κυττάρων παραμένει εκεί ως εφεδρεία.

Άρα, αν και εμβρυονικά, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν στο γενετικό τους πρόγραμμα τον μηχανισμό του αυτόματου κυτταρικού θανάτου, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει με τον καρκίνο.

Εδώ η κατάσταση φαίνεται διαφορετική: Ενώ αρχικά τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν αποπτωτικό μηχανισμό, εν τούτοις, καθώς ο καρκινικός φαινότυπος εμπεδώνεται και εξελίσσεται, χάνουν το πρόγραμμα της απόπτωσης, ή, εναλλακτικά, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφρασή του, δηλαδή αναπτύσσουν υπέρμετρα τον μηχανισμό καταστολής του. Συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να θεωρηθούν αμιγώς εμβρυϊκά, διότι στην περίπτωση αυτή, θα μπορούσαν να προσλάβουν ή να παράγουν τους διαφοροποιητικούς μεσολαβητές και να καταλήξουν σε μια διαφοροποιημένη μορφή διαθέτουσα αποπτωτικό μηχανισμό, οπότε το πρόβλημα θα ήταν περαιτέρω, σχετικά εύκολο να λυθεί.

Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι καρκίνος και εμβρυογένεση είναι μάλλον δύο διαδικασίες αντιθέτου φοράς. Στον καρκίνο το σύστημα συμμόρφωσης απέναντι στις εντολές της σωματικής ιεραρχίας έχει χαθεί, ή υπερκεραστεί, οπότε το κύτταρο έχει αυτονομηθεί και δεν υπακούει πλέον στις συνολικές αναγκαιότητες που διέπουν το σώμα. Άρα για το καρκινικό κύτταρο το σώμα είναι απλώς εξωτερικό περιβάλλον, οπωσδήποτε πηγή τροφής και στήριξης, αλλά εν δυνάμει εχθρικό, μέσα στο οποίο θα δώσει μάχη για να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί και προφανώς μη εξυπηρετώντας τα επιβιωτικά

συμφέροντα τόσο των γειτονικών του φυσιολογικών κυττάρων, όσο και της συνολικής κυτταρικής κομόνας που είναι ο οργανισμός ως σύνολο. Κι εδώ ακριβώς υπεισέρχονται πλέον όλοι οι κανόνες που απαρτίζουν τον νόμο της Φυσικής Επιλογής και της υπό αυτής παραγόμενης Εξέλιξης (μικροεξέλιξης για την ακρίβεια) με στόχο την προσαρμογή του ικανότερου καρκινικού στελέχους στο εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού. Αυτά τα πράγματα αποτελούν και το πρόγραμμα του καρκινικού κυττάρου, το οποίο αν επιτύχει θα καταλήξει στην γενικευμένη νεοπλασματική νόσο και τελικά στον θάνατο του οργανισμού.

Η παράλλαξη του γενετικού προγράμματος που, υπό την μορφή της κακοήθους εξαλλαγής, έδωσε γένεση στο κακόηθες κύτταρο, αποτελεί τώρα ένα γενετικό πρόγραμμα, το οποίο θέλει να επιτύχει, εφαρμόζοντας την πλέον κλασσική μέθοδο κάθε έμβιου όντος: την αναπαραγωγή, την δημιουργία κλώνων και την φυσική επιλογή επί των κλώνων αυτών, προκειμένου να προκύψει ο πλέον προσαρμοσμένος στο εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού. Ας δούμε επί τροχάδην μερικά από τα πλέον ενδιαφέροντα σημεία αυτής της μικροεξελικτικής πορείας του καρκινικού κυττάρου, που αν πετύχει, θα δώσει την συστημική νόσο:

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της καρκινογένεσης, τα απελευθερωμένα από τους ανασταλτικούς αναδραστικούς ελέγχους ογκογονίδια αρχίζουν και παράγουν ποσότητες ογκοπρωτεϊνών, οι οποίες μεταναστεύουν σε διάφορα σημεία του κυττάρου και εξασκούν την δράση τους επί αυτών. Υπό κανονικές συνθήκες τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, τα ευρισκόμενα εν ηρεμία, εισέρχονται σε τροχιά αναπαραγωγής, προκειμένου να αναπληρώσουν τα κύτταρα τα οποία εφθάρησαν. Τα φυσιολογικά κύτταρα παρακινούνται να πολλαπλασιαστούν εκ μέρους των μιτωτικών ή αυξητικών παραγόντων, εκ των οποίων ο πλέον σημαντικός αντιπροσωπεύεται από την αυξητική ορμόνη, η οποία ακολουθεί φυσιολογικώς κιρκαδιάνια διακύμανση.

Η αυξητική ορμόνη εκκρίνεται φυσιολογικώς από την νευροϋπόφυση, κατόπιν παρακίνησης εκ μέρους του υποθαλάμου, ο οποίος ενεργοποιεί την έκκρισή της μέσω ενός Εξειδικευμένου Παράγοντα Απελευθέρωσης. Η αυξητική ορμόνη είναι πεπτιδίο και τα υψηλότερα φυσιολογικώς επίπεδά της επιτυγχάνονται την νύχτα με σκοπό την συνολική αποκατάσταση των φθорών

του σώματος. Η άνοδος των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης φαίνεται ότι παρακολουθεί την άνοδο των επιπέδων της μελατονίνης, η οποία εκκρίνεται από την επίφυση, που, κατά τα φαινόμενα αποτελεί και το κεντρικότερο βιολογικό ωρολόγιο του οργανισμού. Η μείωση του ηλιακού φωτισμού και η έλευση του σκότους είναι τα εξωγενή ερεθίσματα για την έκκριση της μελατονίνης, η οποία προκαλεί ληθαργικότητα και προετοιμάζει τον εγκέφαλο για τον ύπνο. Καθώς ο εγκέφαλος καταστέλλεται το σώμα γίνεται όλο και περισσότερο νωθρό και αδρανές, οπότε η ενέργεια, υπό μορφή ATP αρχίζει να πλεονάζει, ως μη καταναλισκόμενη, για τις κινητικές ανάγκες και να συσσωρεύεται εντός των κυττάρων. Παραλλήλως προς την ύψωση των επιπέδων της μελατονίνης υψώνονται και τα επίπεδα της αυξητικής ορμόνης. Κατά την διάρκεια του κανονικού ύπνου, όταν το σώμα είναι πλήρως ακινητοποιημένο και η θερμοκρασία του χαμηλή, τα επίπεδα της αυξητικής είναι μέγιστα, οπότε και οι δράσεις αυτής επί των κυττάρων μεγιστοποιούνται, ούτως ώστε να γίνει η δυνατόν πληρέστερη επιδιόρθωση όλων των κυτταρικών και ιστικών βλαβών. Η εξαιρετικά παρατεταμένη διάρκεια ύπνου την οποίαν παρουσιάζουν τα νεογέννητα, τα βρέφη και εν γένει, τα παιδιά μεταφράζεται σε αύξηση του οργανισμού. Αύξηση της διάρκειας του ύπνου εμφανίζεται επίσης και εις τους καταπονημένους οργανισμούς, προκειμένου να αυτοεπιδιορθωθούν και να αναλάβουν τις δυνάμεις των. Η συσσωρευμένη ATP χρησιμοποιείται για τις συνθέσεις των κυτταρικών στοιχείων και προφανώς για την σύνθεση του DNA και την αναπαραγωγή των κυττάρων. Ύψωση των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης λαμβάνει χώρα επίσης κατά την διάρκεια της μυϊκής εργασίας, όπως επίσης και όταν ο οργανισμός τελεί υπό καθεστώς αθρεψίας.

Οι δράσεις της αυξητικής ορμόνης είναι πλειότροπες, υπό την έννοια ότι όχι μόνον αφορούν όλα τα κύτταρα του σώματος, αλλά, από την άλλη μεριά κινητοποιούν ένα πολύ μεγάλο αριθμό γονιδίων. Γενικά οι δράσεις αυτές έχουν δύο σκέλη: **1^ο**) Ένα σκέλος μεταβολικό και **2^ο**) Ένα σκέλος μεταγραφικό επί του γονιδιώματος. Τα στοιχεία που απαρτίζουν το μεταβολικό σκέλος είναι, επί τροχάδην τα εξής: Εισροή ιόντων (Na^+ , Ca^{2+}), αλλαγές διαμεμβρανικού δυναμικού, κινητοποίηση αντλιών εισόδου γλυκόζης και αμινοξέων για αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων αυτών, φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, γλυκονεογένεση, αύξηση του ρυθμού της

γλυκόλυσης και γενικότερα προετοιμασία του κυττάρου για την παραγωγή υψηλών ποσοτήτων ενέργειας. Το σκέλος που αφορά την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδιώματος είναι επιβλητικό, καθόσον, σε πρώτη φάση κινητοποιούνται προς μεταγραφή έως 100 διαφορετικά γονίδια, παραγομένων μεγάλων ποσοτήτων αντιστοίχων αγγελιοφόρων RNA. Τα mRNA καθοδηγούν την σύνθεση των αντιστοίχων πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας το πλεόνασμα του παραχθέντος ATP και οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες ενεργοποιούν και άλλες διεργασίες οι οποίες συγκλίνουν στο πέραςμα των κυττάρων στην φάση αναδιπλασιασμού του DNA και προφανώς στην αύξηση των υπολοίπων οργανιδίων προκειμένου να υπάρξει μια ισοκατανομή τους στα θυγατρικά κύτταρα.. Πέραν από την αυξητική ορμόνη και την ινσουλίνη, έχουν τα τελευταία χρόνια βρεθεί στον οργανισμό μια πλειάδα εξειδικευμένων αυξητικών παραγόντων (Αυξητικός Παράγων Νεύρων, Αυξητικός Παράγων Αιμοπεταλίων, Αυξητικός Παράγων Επιδερμίδας, Παράγων Αύξησης Αγγείων κ.ο.κ) οι οποίοι φαίνεται να έχουν ανάλογες αλλά ιστικά εξειδικευμένες δράσεις. Οι δράσεις των ογκοπρωτεϊνών φαίνεται να σχετίζονται με την συνολική διεργασία της αύξησης (233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240).

Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται επιγραμματικά παρακάτω:

A) Ταξινόμηση Ογκοπρωτεϊνών Σχετικώς με την Λειτουργία τους

1. Μιμητές αυξητικών παραγόντων (π.χ αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων)
2. Κινάσες της Tyrosίνης:
 - 2.1. Συνδεόμενες με υποδοχείς (π.χ. με τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα).
 - 2.2. Ανεξάρτητες από τους υποδοχείς πλασματικές τυροσινοκινάσες.
 - 2.3. Ανεξάρτητες από τους υποδοχείς μεμβρανικές τυροσινοκινάσες.
3. Υποδοχείς χωρίς την δραστηριότητα τυροσινοκινασών.
4. Μεμβρανικές G – πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που δεσμεύουν την GTP (προϊόντα της οικογένειας των ογκογονιδίων gas).
6. Μικτές πρωτεϊνοκινάσες (π.χ. σερινο-, θρεονίνο, τυροσινό-κινάσες).
7. Διάφοροι κυτταροπλασματικοί ρυθμιστές.

8. Ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (κυκλίνη D1).
9. Πυρηνικές ογκοπρωτεΐνες, Παράγοντες μεταγραφής κ.λ.π. (προϊόντα των ογκονιδίων c-myc, c-fos, c-jun κ.ο.κ.).
10. Ένζυμα ελέγχου της σωστής μεταγραφής .
11. Πρωτεΐνες με εντόπιση στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων.
12. Αδιευκρίνιστες λειτουργίες.

Οι ογκοπρωτεΐνες της πρώτης κλάσεως λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες που αυτοεκκρίνονται από τα εξαλλαχθέντα κύτταρα και ενεργοποιούν τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού τους καταλαμβάνοντας κανονικούς κυτταροπλασματικούς υποδοχείς και ενεργοποιώντας ομαλούς κυτταρικούς κύκλους. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η σηματοδότηση που οι εν λόγω παράγοντες προκαλούν διαφέρει σε κάποιες λεπτομέρειες από εκείνη που διενεργείται από τους φυσιολογικούς αυξητικούς παράγοντες. Ενδεχομένως οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία κάποιων αναστολέων ικανών να ασκήσουν ανάσχεση στην δράση των αυξητικών ογκοπρωτεϊνών και να χρησιμεύσουν ως νέα αντινεοπλασματικά φάρμακα. Πέραν αυτής της συγκεκριμένης εξωκυττάριας σηματοδότησης κατέστη σαφές ότι η διαταραχή οποιουδήποτε γονιδίου που συμμετέχει στην εκτύλιξη του κυτταρικού κύκλου θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την περαιτέρω διαδικασία.

Επί παραδείγματι αν οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων έχουν έτσι τροποποιηθεί ώστε να παρουσιάζουν υπερδραστικότητα, τότε είναι φανερό ότι μπορούν να ενεργοποιούνται πολύ ευκολότερα και με μεγαλύτερη ένταση, οπότε το επόμενο βήμα της αλληλουχίας των δράσεών τους είναι μονίμως ενεργό με αποτέλεσμα και τα επόμενα βήματα να λειτουργούν αενάως και συνεπώς η διαδικασία πολλαπλασιασμού να είναι διαρκώς σε κίνηση. Σημειωτέον ότι το επόμενο βήμα μετά την κατάληψη του υποδοχέα είναι η ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης διαβίβασης σήματος της οικογένειας Ras, η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση κινάσων της σερίνης και της θρεονίνης. Η συνεχής και γενικευμένη φωσφορυλίωση της σερίνης, εμπλέκοντας και άλλες ογκοπρωτεΐνες οδηγεί τελικά στην κυτταρική διαίρεση.

Γενικεύοντας τα ανωτέρω προκύπτει ότι τα κακοήθη κύτταρα εμφανίζουν σταθερά μια αυτόνομη πυροδότηση του πολλαπλασιασμού των

ιδίων και αυτή τους η ιδιότητα αποτελεί ίσως το κυριότερο και κρισιμότερο χαρακτηριστικό του νεοπλάσματος: Είναι δηλαδή μια διαρκής ανατροφοδοτούμενη θετικώς διαδικασία (θετικό feed back) επικεντρωμένο στην λειτουργία της κυτταρικής διαίρεσης, ανεξάρτητα αν η ενεργοποίησή του αφορά ένα ή περισσότερα σημεία της αλληλουχίας της κυτταροπολλαπλασιαστικής διαδικασίας.

Εάν θελήσουμε να συνοψίσουμε δύο παραλλαγές της ανατροφοδοτικής αυτής διαδικασίας φαίνονται καθαρά:

1^ο) Η ενίσχυση της αυξητικής σηματοδότησης, η οποία προέρχεται από κανονικούς εξωκυττάριους αυξητικούς παράγοντες.

2^ο) Η υποκατάσταση της εξωκυττάριας αυξητικής παρακίνησης από ενδοκυττάριους και αυτοεκκρινόμενους μιμητές των αυξητικών παραγόντων.

Ακόμη μια ποικιλία διαμεμβρανικών μεταβιβαστικών υποδοχέων, σε περίπτωση μεταλλάξεως, είναι σε θέση να καταστήσουν κακοήθεις διάφορες υπό καλλιέργεια κυτταρικές σειρές.

Γενικά, στις περιπτώσεις των διαμεμβρανικών, μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών ενζύμων, ο πλέον διαδεδομένος παθογενετικός μηχανισμός φαίνεται να έχει ως εξής:

Λόγω μεσολάβησης μιας ενθετικής μετάλλαξης ή λόγω απώλειας ενός τμήματος του υπεύθυνου γονιδίου, η προκύπτουσα ενζυμική πρωτεΐνη χάνει εκείνο το τμήμα της επί του οποίου προσδένονται τα ρυθμιστικά μόρια, τα υπεύθυνα για την αναστολή της λειτουργίας της. Το αποτέλεσμα αυτής της απώλειας ρύθμισης είναι να έχουμε αδιάλειπτη λειτουργία του ενεργού κέντρου της, το οποίο έχει παραμείνει άθικτο, καθώς η μετάλλαξη δεν αφορά την γενετική πληροφορία που εξειδικεύει την δομή του, παρά μόνον την γονιδιακή περιοχή που εξειδικεύει το σύστημα ρύθμισης της εν λόγω ενζυμικής πρωτεΐνης.

Συνεπώς η προκύψασα ενζυμική ογκοπρωτεΐνη, έχοντας χάσει τον αρνητικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό που αποκλιμακώνει την ενεργότητά της, εκ μέρους του αποτελέσματος της δράσης της επί του εξειδικευμένου της υποστρώματος, παραμένει ενεργός καθ' όλο το χρονικό διάστημα της ύπαρξής της, μέχρις ότου καταστραφεί. Συνεπώς μιλάμε για μια υπέρ ενεργό ογκοπρωτεΐνη, η οποία, στην περίπτωση των διαφόρων κινασών, φωσφορυλιώνει διαρκώς τα υπολείμματα των αμινοξέων των διαφόρων

πρωτεϊνών που αποτελούν τους στόχους της. Συνεπώς το κακοήθως εξαλλαγμένο κύτταρο ευρίσκεται σε μια σταθερή διέγερση πολλών λειτουργιών και δομών, εξαιρετικά δαπανηρή σε υλικά και ενέργεια, η οποία απολήγει πάντοτε σε μιτώσεις χωρίς σκοπό, καθόσον, στα φυσιολογικά κύτταρα ο πολλαπλασιασμός συμβαίνει με σκοπιμότητα και κυβερνάται τόσο από ενδοκυττάριους και εξωκυττάριους μηχανισμούς, κατά τα φαινόμενα υψηλής ακρίβειας και με κεντρικό επίπεδο ελέγχου (υποθάλαμος – υπόφυση).

Στον καρκίνο οι παραλήπτες των μηνυμάτων αναστολής του πολλαπλασιασμού δεν είναι λειτουργικοί και το κακόηθες κύτταρο λειτουργεί σαν να λαμβάνει συνεχώς την παρακίνηση του πολλαπλασιασμού, χωρίς την ικανότητα να λάβει την πληροφορία του τερματισμού του. Μάλλον το σύστημα αναστολής του πολλαπλασιασμού ελλείπει από το καρκινικό κύτταρο ή είναι πάρα πολύ εξασθενημένο και αναποτελεσματικό. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει μια στρατηγική αντιμετώπισης του καρκίνου, την οποία θα συζητήσουμε κατωτέρω.

Συνεχίζοντας την επισκόπησή μας στον ρόλο των ογκοπρωτεϊνών πρέπει να πούμε ότι οι πυρηνικές ογκοπρωτεΐνες φαίνεται να αποτελούν παράγοντες μεταγραφής των εναρκτήριων κωδικονίων πολλών άλλων γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που η λειτουργία τους σχετίζεται με την κυτταρική διαίρεση. Η δραστηριότητά τους αυτή μπορεί να ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης.

Η εκδήλωση του κακοήθους φαινοτύπου, μέσω ογκογονιδίων, φαίνεται να εξαρτάται, σε σημαντικό βαθμό, από τον αρχικό ιστολογικό τύπο του κυττάρου, από το οποίο, μέσω της καρκινικής μετάλλαξης, δημιουργήθηκε το κακόηθες κύτταρο. Κάθε ιστολογικός τύπος όγκου διατηρεί μερικά χαρακτηριστικά του ιστού από τον οποίο προέρχεται, πράγμα το οποίο αντικατοπτρίζει και τον βαθμό της διαφοροποίησής του, με την οποία θα ασχοληθούμε κατωτέρω. Φαίνεται ότι η κακοήθης μετάλλαξη δημιουργεί εκφράσεις ογκογονιδίων χαρακτηριστικές του ιστού προέλευσης του καρκινικού κυττάρου, οπότε και οι αντίστοιχες ογκοπρωτεΐνες αντικατοπτρίζουν αυτή την εξειδικευμένη ιστοική καταγωγή.

Ενδεχομένως το φαινόμενο αυτό να ερμηνεύεται βάσει της υπόθεσης ότι οι διάφοροι ιστοί, εκφράζουν διαφορετικούς τύπους πρωτοογκογονιδίων

και, κατά συνέπεια, η κακοήθης μετάλλαξη να επιφέρει μεταβολές σε αυτά και στην σχετική τους έκφραση.

Αν προσεγγίσουμε το θέμα από την πλευρά των ογκογόνων ιών, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι χαρακτηριστικές ιστικές υπερεκφράσεις ογκογονιδίων ενδεχομένως οφείλονται στους εκλεκτικούς ιστικούς τροπισμούς των διαφορετικών ογκογόνων ιών. Για παράδειγμα, ο ιός των Epstein – Barr, ο οποίος προκαλεί το λέμφωμα Burkett, εμφανίζει μια εκλεκτική διείσδυση στους λεμφοαδενικούς ιστούς, ενώ ο HIV-1 εμφανίζει μια εκλεκτικότητα μόλυνσης των λεμφοκυττάρων T ή ορισμένων υποπληθυσμών τους. Επίσης ο ιός της ηπατίτιδας C (όπως επίσης και ο της B), οι οποίοι έχουν και ογκογόνο συμπεριφορά, είναι σε θέση να μολύνουν εκλεκτικά τον ηπατικό ιστό, ενώ διάφοροι τύποι άλλων ογκογόνων ιών στοχεύουν εκλεκτικά άλλους ιστούς. Στην περίπτωση αυτή εφ' όσον οι ογκογόνοι ιοί είναι κομιστές διαφορετικών ογκογονιδίων, συνάγεται το συμπέρασμα ότι θα προκαλέσουν την υπερέκφραση του πρωτοογκογονιδίου στόχου τους. Ανεξαρτήτως του ερμηνευτικού μηχανισμού η υπερέκφραση κάποιων συνόλων ογκοπρωτεϊνών συσχετίζεται με ορισμένους τύπους καρκίνων. Παραμένει πάντοτε το ερώτημα του αν δηλαδή αυτό είναι πρωτεύον αίτιο ή αποτέλεσμα.

Αυτό που πρέπει να διατηρήσουμε στην μνήμη μας είναι ότι οι διάφοροι τύποι των εν ενεργεία ογκογονιδίων, αντανακλούν ιδιαιτερότητες του κυτταρικού κύκλου συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Η ιστολογική προέλευση έχει δηλαδή σημασία για τον τύπο των ενεργοποιούμενων ογκογονιδίων.

Τα δεδομένα αυτά αν και φαίνονται να έχουν έναν θεωρητικό χαρακτήρα μπορούν, ωστόσο, να αποβούν ιδιαίτερος ωφέλιμα για την θεραπευτική του καρκίνου, καθόσον δίνουν έδαφος για την υλοποίηση εξαιρετικά στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών μέσω χορήγησης εκλεκτικών αναστολέων των εκάστοτε ογκοπρωτεϊνών και ογκογονιδίων. Το σημείο αυτό θα αναπτυχθεί στο κεφάλαιο στο οποίο συζητείται η θεραπευτική της νεοπλασματικής νόσου και οι προοπτικές της.

Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημάνουμε και μια άλλη σειρά φαινομένων:

Όπως προαναφέραμε τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεν εμβρυϊκές ιδιότητες, αλλά από την άλλη πλευρά παρουσιάζουν και κάποιον βαθμό

διαφοροποίησης. Γενικά ισχύει ο κανόνας ότι όσο χαμηλότερη είναι η διαφοροποίηση τόσο εντονότερη είναι η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κακοηθών κυττάρων και το αντίστροφο, αν και ο κανόνας αυτός δεν είναι απόλυτος. Επίσης η ύπαρξη διαφοροποίησης εμφανίζει μια θετική συσχέτιση με την λειτουργία του μηχανισμού του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή την απόπτωση. Επίσης η ύπαρξη υψηλής διαφοροποίησης φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με την ικανότητα μετάστασης, υπό την έννοια ότι όσο περισσότερο διαφοροποιημένο είναι ένα καρκινικό κύτταρο τόσο καλύτερα είναι ενταγμένο στον ιστό από τον οποίο κατάγεται και τόσο δυσκολότερα δίδει μεταστατικές αποικίες. Όλα αυτά τα φαινόμενα έχουν, φυσικά, σχετική ισχύ και δεν είναι απόλυτα. Η καταστολή του πολλαπλασιασμού δεν συνεπάγεται αυτόματα την δημιουργία διαφοροποίησης αλλά η εισαγωγή διαφοροποίησης μεταφράζεται σε επιβράδυνση ή και ομαλοποίηση του πολλαπλασιασμού. Η εμβάθυνση στην κατανόηση των μηχανισμών που ενεργοποιούν διαφοροποίηση μας έδωσε την δυνατότητα της καταστολής του κακοήθους φαινοτύπου ακόμη και αν η κακοήθης εξαλλαγή έχει επισυμβεί.

Η ενεργοποίηση της διαφοροποιητικής διαδικασίας είναι σε θέση να καταστείλει την έκφραση γενετικών διαταραχών κακοήθους φύσεως, χωρίς να προϋποθέτει τον πλήρη έλεγχο του πολλαπλασιασμού ή να συνεπάγεται απαραίτητα παρέμβαση στο γονιδίωμα. Απλά η παρακίνηση της διαφοροποιητικής διαδικασίας μπορεί να ενεργοποιήσει τις γενετικές εφεδρείες του κυττάρου οδηγώντας στην έκφραση χαρακτήρων που ευρίσκονται γενετικώς ανέπαφοι στο γονιδίωμά του και να εξαναγκάσει κάποιους από αυτούς να εκφραστούν κατά κυρίαρχο τρόπο, υποβάλλοντας όλη την υπόλοιπη λειτουργία του κυττάρου σε μια προσαρμογή που εξυπηρετεί την εγκαταστημένη διαφοροποίηση. Μέσα στα πλαίσια αυτής της λειτουργικής πειθαρχίας είναι σε θέση να υπερκαλυφθεί η έκφραση του καρκινικού φαινότυπου. Η όλη αυτή διεργασία υποδεικνύει ότι τα φαινόμενα που εμφανίζονται στον καρκινικό φαινότυπο είναι ζήτημα δυναμικών ισορροπιών στην έκφραση των γονιδίων. Αν δηλαδή αυξηθεί η έκφραση κάποιων γονιδίων που δίνουν την γενετική σφραγίδα της διαφοροποίησης προς μια κατεύθυνση, αναγκαστικά ο καρκινικός φαινότυπος θα κατασταλεί. Πειράματα τέτοιας κατεύθυνσης έγιναν την δεκαετία του '80 και έδειξαν ότι η

σύντηξη φυσιολογικών κυττάρων με καρκινικά κύτταρα κατέστειλαν τον καρκινικό φαινότυπο, αν και η εξαλλαγή εξακολουθούσε να υφίσταται.

Αυτά τα πειράματα κυτταρικού υβριδισμού αν και δεν ήταν πειράματα διαφοροποίησης εν τούτοις έδιναν ένα παράδειγμα του μοντέλου δράσης των υπαρχουσών διαφοροποιήσεων. Πολλοί σημαντικοί διαφοροποιητικοί παράγοντες είναι τα ρετινοειδή με βασικούς εκπροσώπους τα καροτένια, την ρετινόλη (βιταμίνη Α) και τα διάφορα ρετινοϊκά οξέα. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ουσίες αυτές είναι εν δυνάμει μεταλλαξιγόνες αλλά η γενετική μεταβολή που επιφέρουν στρέφει το κύτταρο προς έναν συγκεκριμένο ιστικό προσανατολισμό. Δηλαδή η απόσβεση της έκφρασης κάποιων γονιδίων γίνεται με μια εκλεκτικότητα ούτως ώστε να σιγήσουν τα εν λόγω γονίδια, αφήνοντας εκείνα τα οποία εκφράζουν τους χαρακτήρες του υπό διαμόρφωση ιστού να κυριαρχήσουν και να συμμορφώσουν την μορφολογία και την λειτουργία του διαφοροποιούμενου κυττάρου προς τα αντίστοιχα μορφολειτουργικά χαρακτηριστικά του ιστού που, τοιουτοτρόπως, δημιουργείται.

Η μελέτη της διαφοροποίησης σε μοριακό επίπεδο έδωσε μια πρώτη εικόνα του ρόλου ορισμένων κυτταρικών ρυθμιστών (κυτταροπλασματικοί ρυθμιστές και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου). Πριν την τελική διαφοροποίηση γίνεται ανάσχεση του πολλαπλασιασμού και το κύτταρο συγκρατείται στην φάση ηρεμίας, πράγμα το οποίο επιτυγχάνεται δραστηκώς μέσω αναστολής της λειτουργίας της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης – cdk. Συνεπώς το διαφοροποιητικό ερέθισμα ενεργοποιεί την αναστολή της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης.

Οι κυκλίνες οι οποίες σχετίζονται με την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση είναι αρκετές και συνεπώς το εν λόγω ένζυμο φαίνεται να είναι κρίσιμης σημασίας για την λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Στο σημείο αυτό πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι η δραστηκότητα του συμπλέγματος κυκλίνη – cdk εξαρτάται από την γενική φωσφορυλιωτική κατάσταση του κυττάρου.

Οι εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες ασκούν τις δράσεις τους μέσω της ενδοκυτταρικής ακολουθίας κινασών, το τελικό αποτέλεσμα της οποίας είναι η ενεργοποίηση πυρηνικών πρωτεϊνών και η αύξηση μεταγραφής γονιδίων για κυκλίνες και άλλων γονιδίων. Τελικώς οι κυκλίνες απελευθερώνουν την μετάφραση ενός συνόλου πρωτεϊνών, οι οποίες είναι αναγκαίες για την είσοδο

του κυττάρου στην φάση αναδιπλασιασμού του DNA (Φάση S, ή Σύνθεσης). Από τα δεδομένα φαίνεται ότι η δραστική αναστολή του κύκλου μπορεί να επιτευχθεί από τις κυκλίνες E και D τύπων. Η κυκλίνη D καταστέλλει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (πρωτεΐνη RB), η οποία έχει γενική ανασταλτική δράση επί του κυτταρικού κύκλου. Ο έλεγχος του συμπλέγματος D κυκλίνη - cdk διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες p15 και p16. Το σύμπλοκο της κυκλίνης E – cdk δρα άμεσα σε διάφορους παράγοντες μεταγραφής και καταστέλλεται δραστικά από την ακολουθία των πρωτεϊνών p53 – p21.

Πριν κλείσουμε την σύντομή μας επισκόπηση επί του θέματος των δράσεων των ογκοπρωτεϊνών επί του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων θα αναφέρουμε επί τροχάδην δύο ακόμη φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική αναπαραγωγή:

1^{ον}) Τον ρόλο σ' αυτήν της απόπτωσης και

2^{ον}) τον ρόλο των τελομερών των χρωμοσωμάτων.

Και τα δύο αυτά φαινόμενα έχουν να κάνουν με τον μηχανισμό της αναστολής της ανάπτυξης στα φυσιολογικά κύτταρα. Αν η κυτταρική ανάπτυξη ήταν ένα φαινόμενο χωρίς ενδογενείς φραγμούς, τότε πολύ σύντομα θα ακολουθούσε μια εκρηκτική πορεία η οποία περιγράφεται από μια εκθετική εξίσωση, γνωστή ως λογιστική εξίσωση. Πολύ σύντομα το πλήθος των παραγόμενων κυττάρων θα γινόταν τεράστιο, πράγμα το οποίο είναι ασύμβατο με την επιβίωση ενός οιοδήποτε πολυκύτταρου οργανισμού κι όχι μόνον του ανθρώπου. Η Φυσική επιλογή έχει δημιουργήσει τουλάχιστον δύο μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης προκειμένου να αναχαιτίσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ακόμη και όταν αυτός διεγείρεται από την δράση αυξητικών παραγόντων. Τα δεδομένα επί των οποίων στηρίξαμε την συγγραφή των προηγούμενων σελίδων για τον ρόλο των ογκοπρωτεϊνών έχουν ληφθεί από τις ακόλουθες βιβλιογραφικές παραπομπές: 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276.

B) Ο ρόλος της απόπτωσης

Και να δράσουν, λοιπόν, οι αυξητικοί παράγοντες επί του κυττάρου, το φυσιολογικό σωματικό κύτταρο θα ενεργοποιήσει αυτόματα αυτούς τους μηχανισμούς αρνητικής ρύθμισης. Ως κρίσιμος παράγων αρνητικής ρύθμισης της αύξησης πρέπει να αναφερθεί η πρωτεΐνη p53, που διέπει επίσης και τον αυτόματο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).

Η απόπτωση αποτελεί μια γενετικώς προγραμματισμένη διαδικασία, κατά την οποία ενεργοποιείται ένα πολύπλοκο σύνολο σηματοδοτικών αντιδράσεων που ακολουθείται από την ρήξη των λυσοσωμάτων και την απελευθέρωση των λυτικών τους ενζύμων στο εσωτερικό του κυττάρου, την συρρίκνωση των μιτοχονδρίων, τον κατακερματισμό της χρωματίνης και την συρρίκνωση του πυρήνα. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη εξασθενεί σε πολλά της σημεία και εμφανίζει τον σχηματισμό φυσαλιδοειδών προεκβολών, με αποτέλεσμα τον τελικό διαμελισμό του κυττάρου. Είναι γνωστό ότι η ρήξη των λυσοσωμάτων σηματοδοτεί και το λεγόμενο σημείο της μη επιστροφής με αναγκαστική και μη αντιστρέψιμη την πορεία του κυττάρου προς τον θάνατο.

Η απόπτωση επέρχεται συνήθως ως αποτέλεσμα γενετικής αλλοίωσης του κυττάρου και φαίνεται ότι αποτελεί μια δικλείδα ασφαλείας, η οποία αναγκάζει τα κύτταρα να αποθνήσκουν όταν το γενετικό τους πρόγραμμα έχει διασαλευτεί και εγκυμονεί εν δυνάμει κινδύνους για το σύνολο του οργανισμού, όπως π.χ. τον κίνδυνο να μετατραπούν σε κακοήθη κύτταρα και να απειλήσουν την συνολική υπόσταση του οργανισμού. Υπό την έννοια αυτή, δεδομένου ότι η κακοήθης εξαλλαγή είναι, εκ των πραγμάτων γενετική αλλοίωση, θα αναμέναμε ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης έπρεπε αυτομάτως να πυροδοτείται και στην περίπτωση αυτής της γενετικής βλάβης.

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης φαίνεται να διατηρείται στα πρώιμα στάδια της κακοήθειας και μετά ελλείπει τελείως. Τούτο είναι εξακριβωμένο π.χ. για τα σαρκώματα των μαλακών μορίων. Τα κακοήθη κύτταρα πιθανότατα αποφεύγουν τον αυτόματο κυτταρικό θάνατο μέσω κατάλληλων αναστολέων. Επί παραδείγματι υπάρχει ένα γονίδιο, το λεγόμενο Bcl-2, το οποίο δημιουργεί αναστολή της απόπτωσης. Στο σημείο αυτό, πρέπει να σημειωθεί, ότι η αποφυγή της απόπτωσης φαίνεται απαραίτητη για την σταθεροποίηση της κακοήθειας. Άρα μπορούμε να θεωρήσουμε, εκ προοιμίου, ότι αυτός ο αρνητικός ανατροφοδοτικός

μηχανισμός της αναστολής της αύξησης έχει καμφθεί στον καρκίνο. Δεν γνωρίζουμε, ωστόσο, αν αυτή η κάμψη είναι αποτέλεσμα της κακοήθους εξαλλαγής ή αν σχετίζεται με την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στις αντιξοότητες του εσωτερικού περιβάλλοντος του σώματος, οπότε θα ήταν αποτέλεσμα ενδοοργανισμικής μικροεξέλιξης, κατά την Δαρβινική έννοια (277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287).

Γ) Ο ρόλος των τελομερών

Εκτός από την απόπτωση ο δεύτερος κρίσιμος ενδογενής γενετικός μηχανισμός που ρυθμίζει αρνητικά τις επαναλήψεις των κυτταρικών μιτώσεων σχετίζεται με την ύπαρξη ενός ανώτερου αριθμού διαιρέσεων των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων.

Μας είναι γνωστό από αρκετά χρόνια ότι, υπό συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, ότι τα φυσιολογικά κύτταρα δεν είναι δυνατόν να υποστούν παρά έναν πεπερασμένο αριθμό διαιρέσεων ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ των 50 – 60 μιτώσεων καθ' όλη την διάρκεια επιβίωσης μιας φυσιολογικής κυτταρικής γραμμής. Μετά την συμπλήρωση αυτού του οριακού αριθμού διαδοχικών μιτώσεων τα φυσιολογικά κύτταρα σταματούν την αύξησή τους και επιδεικνύουν προοδευτικώς σημεία γήρατος, τα οποία καταλήγουν στον θάνατό τους. Τα δεδομένα αυτά εξήχθησαν και από συγχρονισμένες καλλιέργειες κυττάρων, στις οποίες, ως γνωστόν, όλα τα κύτταρα ευρίσκονται στην αυτή φάση του κυτταρικού κύκλου. Το μεγάλο πλήθος των πειραμάτων αυτών, τα οποία διεξήχθησαν με κύτταρα τόσο του ανθρώπου, όσο και άλλων ειδών, έδειξε ότι οι δυνατότητες του πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών σωματικών κυττάρων είναι περιορισμένες και όταν υπερκαλυφθούν θα ενσκήψει αναγκαστικά το γήρας και ο θάνατος.

Υπό την έννοια αυτήν όλα τα κύτταρα έχουν προγραμματιστεί γενετικώς για να εμφανίζουν « ημερομηνία λήξης». Είναι πολύ πιθανόν, όπως ήδη έχουμε προαναφέρει, ότι αυτή η κατάσταση αντανακλάται και στο επίπεδο του οργανισμού, εφ' όσον αυτός δεν παύει να είναι ένα σύστημα το οποίο αναγκαστικώς αντικατοπτρίζει τις ιδιότητες των τμημάτων του, άσχετο αν η τελική συστημική συνισταμένη είναι αθροιστικού χαρακτήρα ή έχει ιδιότητες γινομένου. Με απλά λόγια το άθροισμα της γήρανσης των επί

μέρους κυττάρων φαίνεται να αποτελεί το γήρας του συνολικού οργανισμού. Στον καρκίνο αυτός ο κανόνας δεν ισχύει καθόσον το καρκινικό κύτταρο δεν έχει περιορισμένο αριθμό διαδοχικών μιτώσεων, αλλά δυνητικά απεριόριστο και δεν εμφανίζει στοιχεία γεροντικής παρακμής μετά την κάλυψη ενός ορίου μιτώσεων, όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά κύτταρα. Για να αναπτυχθεί σταθερή κακοήθεια το γενετικό πρόγραμμα του περιορισμού τον αριθμό των μιτώσεων πρέπει να αποφευχθεί. Ένας τρόπος αποφυγής αυτού του προγράμματος συζητείται κατωτέρω:

Όπως είναι γνωστό, ο τρόπος αναδιπλασιασμού του DNA πραγματοποιείται διαφορετικά για τις δύο έλικες που συνιστούν την διπλή έλικα. Ενώ στην κατεύθυνση 5' - 3' προχωρεί ευθέως, ή άλλη έλικα ανασυντίθεται τμηματικώς και κάθε τμήμα αυτής απαιτεί την παρουσία μιας αρχικής μικρής σε αριθμό βάσεων αλληλουχίας RNA επί της οποίας συνδέεται και πραγματοποιεί το συνθετικό της έργο το ένζυμο της DNA μεταγραφάσης. Η RNA αλυσίδα σχηματίζεται συμπληρωματικά ως προς την μητρική έλικα. Όταν έρχεται η στιγμή της σύνθεσης του ακροτελεύτιου τμήματος, τότε ένα ένζυμο, γνωστό ως τελομεράση προσθέτει επί πλέον νουκλεοτίδια στο άκρο της υπό αναδιπλασιασμό έλικας, τα οποία συναποτελούν το λεγόμενο τελομερές. Τα τελομερή αυτά χρησιμεύουν μετά ως πρότυπο για την σύνθεση του RNA – τελικού τμήματος. Από τον εν λόγω τρόπο αναπαραγωγής της μιας εκ των ελίκων του DNA προκύπτει ότι χωρίς την ύπαρξη της δραστηριότητας των τελομερασών κάθε κυτταρική διαίρεση θα συνοδεύεται από την απώλεια του γενετικού υλικού που αντιπροσωπεύεται από το ακροτελεύτιο τμήμα της έλικας αυτής. Εν συνεχεία ο επίμονος πολλαπλασιασμός θα οδηγούσε στην προοδευτική απώλεια γενετικής πληροφορίας και στον συνακόλουθο εκφυλισμό του γονιδιώματος καθιστώντας τα κύτταρα μη βιώσιμα. Ευρέθη λοιπόν ότι ενώ οι τελομεράσες λειτουργούν στα εμβρυϊκά κύτταρα, είναι κατεσταλμένες στα σωματικά κύτταρα. Περαιτέρω διαπιστώθηκε ότι οι τελομεράσες είναι δραστικές στην πλειοψηφία των επιθετικών καρκίνων.

Γενικά, βάσει των δεδομένων αυτών, πιστεύεται ότι οι ενεργοποιημένες τελομεράσες συμβάλουν στην άρση του αυτόματου γενετικού εκφυλισμού και συνεπώς του αυτόματου κυτταρικού θανάτου, συμβάλλοντας τοιούτοτρόπως και στην εγκατάσταση της αθανασίας των καρκινικών κυττάρων.

Αλλά η φωσφορυλλίωση αποτελεί τον γενικότατο μηχανισμό ενεργοποίησης που χρησιμοποιείται από κάθε είδους κύτταρο προκειμένου αυτό να ενεργοποιήσει τις οποιεσδήποτε δομές και λειτουργίες του. Η αδιάλειπτη φωσφορυλλίωση που πραγματοποιούν εκείνες από τις ογκοπρωτεΐνες με χαρακτήρα φωσφοκινάσης μεταφράζεται σε αδιάλειπτη ενεργοποίηση κάποιων κυτταρικών δομών και λειτουργικών διαδικασιών οι οποίες, για τον λόγο αυτόν, απαιτούν την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων ATP.

Όπως προαναφέρουμε δεν αρκεί σε ένα κύτταρο να είναι μόνον αθανатоποιημένο για να είναι καρκινικό, αλλά, ταυτοχρόνως, απαιτείται και η απώλεια των ρυθμιστικών μηχανισμών που αναγκάζουν το κύτταρο να μην πολλαπλασιάζεται ή, διαφορετικά, να ενεργοποιείται η λειτουργία του πολλαπλασιασμού μόνον όταν υπάρχει η αντίστοιχη αναγκαιότητα. Άρα εδώ φαίνεται ότι η κακοήθης εξαλλαγή εμπεριέχει μέσα στην δομή της στοιχεία τα οποία εκμηδενίζουν τους μηχανισμούς αναστολής της πολλαπλασιαστικότητας, δηλαδή το σύνολο των ενδογενών κυκλωμάτων αρνητικής ανατροφοδότησης της λειτουργίας του πολλαπλασιασμού. Τα φυσιολογικά κύτταρα όταν τελούν εν ηρεμία και υπό ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας έχουν την τάση να σταθμεύουν το σύνολο των λειτουργιών τους σε ένα σημείο του κυτταρικού κύκλου που καλείται σημείο G_0 και που ανήκει στο γενικότερο διάστημα G_1 . Η στέρηση τροφής από τα κύτταρα, όπως επίσης και η επιβράδυνση του μεταβολισμού τους τα αναγκάζει να ισορροπούν στο σημείο G_0 . Με τον τρόπο αυτό ένα κύτταρο μπορεί να γίνει ιδιαίτερος μακρόβιο.

Ίσως η επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης που παρατηρείται, γενικά, σε πάρα πολλά έμβια όταν μειώνεται η είσοδος θερμίδων να αντανακλά σε επίπεδο οργανισμού αυτό που συμβαίνει σε κυτταρικό επίπεδο. Η οικονομικότητα στην κυτταρική λειτουργία, γνωρίζουμε από αρκετές δεκαετίες ότι, αποτελεί έναν πολύ σοβαρό κανόνα ο οποίος δεν παραβιάζεται αλλά διαρκώς συνυπολογίζεται σε όλες τις καταστάσεις. Συνεπώς εδώ, έχουμε μια απώλεια αυτού του feed back και μάλιστα πάρα πολύ σοβαρή καθόσον ο πολλαπλασιασμός απαιτεί την διαρκή σύνθεση όλων των κυτταρικών στοιχείων κι όχι μόνον εκείνων της γενετικής συσκευής.

Τα καρκινικά κύτταρα, υπό αυτήν την έννοια, είναι ιδιαιτέρως ενεργοβόρα συστήματα, πράγμα το οποίο μεταφράζεται και στην τραγική σωματική παρακμή που ο καρκίνος, συνολικά, προκαλεί στον οργανισμό που είναι ο ξενιστής του.

Η μικρή αυτή ανάλυση μας οδηγεί στους συλλογισμούς:

- 1^ο) Οι παράγοντες που αναγκάζουν τα κύτταρα να σταθμεύουν στο σημείο G₀ δεν λειτουργούν στο καρκινικό κύτταρο.
- 2^ο) Ο μόνος τρόπος να τιθασευτεί η πολλαπλασιαστική αναρχία του καρκινικού κυττάρου είναι η στέρηση των υλικών που απαιτεί για την αναπαραγωγή του.
- 3^ο) Η στέρηση των βασικών ενεργειακών υποστρωμάτων και κυρίως της γλυκόζης και των γλυκογενετικών αμινοξέων είναι στρατηγικής σημασίας για την τιθάσευση της καρκινικής αναπαραγωγής.
- 4^ο) Η εκλεκτική αναστολή της αραχιδονικής οδού φαίνεται να ελαχιστοποιεί την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων.
- 5^ο) Η εκλεκτική αναστολή της γλυκόλυσης φαίνεται να αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα αποδυνάμωσης της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων.
- 6^ο) Η αναστολή των διαδικασιών εξωκυττάρωσης των λυτικών ενζύμων των λυσοσωμάτων των καρκινικών κυττάρων ελαχιστοποιεί την ικανότητα των όγκων να διαβρώνουν τους παρακείμενους ιστούς.
- 7^ο) Η μείωση της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και η παράλληλη μείωση της παραγωγής αιμοπεταλιακών διεγερτών εκ μέρους του καρκινικού κυττάρου φαίνεται ότι ελαχιστοποιεί τις δυνατότητες αιματογενούς διασποράς των όγκων και συνεπώς της δημιουργίας μεταστατικών αποικιών σε μεγάλη απόσταση από τον πρωτοπαθή όγκο.
- 8^ο) Η ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων T και των λεμφοκυττάρων Φυσικών Φονέων αποτελεί πολύ ισχυρό όπλο για την αντιμετώπιση τόσο των πρωτοπαθών όγκων όσο και των μεταστάσεων (288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295).

. Μερικοί από τους συλλογισμούς αυτούς δοκιμάστηκαν μέσα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, όπως θα δούμε παρακάτω.

III. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΜΕΣΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζουμε, περιληπτικά, μερικές από τις βασικές θεωρήσεις οι οποίες αποτελούν και την βάση για την θεραπευτική του καρκίνου στην εποχή μας. Εκτός από τα κυρίως ακολουθούμενα αντικαρκινικά πρωτόκολλα του βασικού αντικαρκινικού δόγματος (χειρουργική αντιμετώπιση, χημειοθεραπευτικά, ακτινοβολίες) κάνουμε μια αδρή περιγραφή και μερικών άλλων αντικαρκινικών πρωτοκόλλων τα οποία έχουν κατά καιρούς δημοσιευτεί και μελετηθεί σε πολυκεντρικές μελέτες ή σε μελέτες μικρότερου μεγέθους. Αναγκαστικά δεν θα γίνει εκτεταμένη περιγραφή, η οποία εκφεύγει από τα όρια της ανά χείρας διατριβής.

A) Η θεραπευτική των κακοηθών όγκων σε συνάρτηση με την βιολογία του καρκίνου.

Όλα τα έμβια όντα εμφανίζουν σαν θεμελιοδέστερη λειτουργία τους την λειτουργία του πολλαπλασιασμού, καθόσον χωρίς αυτόν η συνέχεια της ζωής καθίσταται αδύνατη. Άτομο προς άτομο, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί κάθε είδους είναι αναγκασμένοι να αποθάνουν, καθόσον την έκβαση αυτή την επιβάλλουν τόσο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όσο και το γενετικό πρόγραμμα ενός εκάστου εκ των ζώντων συστημάτων. Είναι σήμερα σαφές ότι η επιλογή της θνητότητας των ατόμων και η αντιρρόπησή της από την αναπαραγωγή απετέλεσε μια αναγκαιότητα προκειμένου να εξυπηρετηθεί μέσω φυσικής επιλογής η αύξηση της προσαρμοστικής ευκαμψίας των ειδών. Σημειωτέον ότι τα είδη ενεργούν όχι ως μεμονωμένα άτομα, αλλά ως ενιαία σύνολα, θυμίζοντας λίγο την λογική των ενιαίων ολοκληρωμένων οργανισμών. Έτσι μέσω θνητών ατόμων και δια της λειτουργίας της αναπαραγωγής διασφαλίζεται η δυνητικά αθανασία των έμβιων ειδών και ταυτοχρόνως η βιολογική τους προσαρμοστική εξέλιξη.

Το πρότυπο αυτό ισχύει, εν πολλοίς και στους πολυκύτταρους οργανισμούς, οι οποίοι θα μπορούσαν να προσομοιωθούν με πολύ οργανωμένες κυτταρικές αποικίες, στις οποίες υπάρχει αυστηρός καταμερισμός εργασίας, αντιπροσωπευόμενος από τις δομές ιστών και οργάνων, όπως επίσης και υψηλή συνέργια μεταξύ των εξειδικευμένων

κυτταρικών ομάδων, εκφραζόμενη από τις λειτουργικές σχέσεις των μερών τόσο μεταξύ τους όσο και προς το σύνολο. Ενώ στους μονοκύτταρους οργανισμούς η αναπαραγωγή είναι κυριολεκτικά ελεύθερη και καταστέλλεται μόνον από εξωτερικούς φραγμούς - κυρίως έλλειψη ζωτικού χώρου, τροφής και σύγκρουση με άλλα είδη - στους πολυκύτταρους οργανισμούς το πολλαπλασιαστικό καθεστώς των κυττάρων ευρίσκεται υπό διαρκή εσωτερικό έλεγχο, ο οποίος πραγματοποιείται τόσο από ενδοκυττάρους όσο και από εξωκυττάρους παράγοντες.

Το φρένο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενός κλώνου, είναι ο μόνος τρόπος για να αναχαιτιστεί η υπερανάπτυξή του προς όφελος της συνολικής κυτταρικής κοινωνίας που απαρτίζει τον οργανισμό. Γενικά τα κύτταρα των ιστών κάθε πολυκύτταρου όντος μέσα στα πλαίσια του οργανισμού σταματούν να πολλαπλασιάζονται και φθάνουν σε μια σταθερή κατάσταση όταν το μέγεθος των οργάνων του σώματος καταστεί φυσιολογικό. Η σταθερή αυτή κατάσταση εκφράζεται από μια ισοσκελισμένη ισορροπία μεταξύ κυτταρικών θανάτων και κυτταρικών αναπαραγωγών.

Βάσει των πολλαπλασιαστικών τους ιδιοτήτων διακρίνουμε στο σώμα τρεις γενικές τάξεις φυσιολογικού ιστού: Την ανανεούμενη τάξη (μυελός των οστών, γενετικά κύτταρα, επιθήλια δέρματος και βλεννογόνων), την επεκτεινόμενη τάξη (ήπαρ, νεφρός και ενδοκρινείς αδένες) και την στατική τάξη (νευρώνες και γραμμωτοί μύες).

Στην περίπτωση των στατικών ιστών, όπως είναι οι ιστοί του νευρικού συστήματος, τα κύτταρά τους διαρκούν όσο διαρκεί και η ζωή του ατόμου, στον οργανισμό του οποίου ανήκουν, και φυσιολογικά, δεν αντικαθίστανται εάν καταστραφούν παρά τα εναπομείναντα κύτταρα αναπληρώνουν τις λειτουργίες εκείνων που πέθαναν.

Στην περίπτωση των εκτεινομένων ιστών, το μιτωτικό δυναμικό εκδηλώνεται μόνον όταν επέλθει απώλεια κυττάρων (τραύμα, χειρουργική εκτομή, φυσιολογική απόπτωση), με στόχο την αντικατάσταση του ιστού και την αναπλήρωση της δομής και λειτουργίας του τμήματός του που χάθηκε.

Τέλος, στην περίπτωση των ανανεούμενων ιστών, τα ώριμα κύτταρα αυτών εμφανίζουν καθορισμένη, συνήθως βραχεία διάρκεια ζωής και συνεχιζόμενη αντικατάσταση από κλωνογόνα κύτταρα (δεξαμενή βλαστικών

κυττάρων). Εφόσον η παραγωγή κυττάρων δεν υπερβαίνει την απώλεια, δεν υφίσταται ορατή μακροσκοπικώς νεοπλασματική εξεργασία.

Ανεξαρτήτως από το είδος του ιστού προέλευσης, φαίνεται ότι η αύξηση του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων μοιάζει με εκείνη της ανανέωσης των φυσιολογικών ιστών. Σε μερικά κύτταρα παρουσιάζεται ωρίμανση. Δηλαδή, μολονότι υφίστανται αλληπάλληλες διαιρέσεις, για ορισμένο χρονικό διάστημα, χάνουν την ικανότητά τους να δημιουργούν νέες αποικίες και παραμένουν σε μια κατάσταση ηρεμίας. Όμως, μια υποομάδα του νεοπλασματικού κυτταρικού πληθυσμού, ως επί το πλείστον μικρή, διατηρεί ανέπαφη την ικανότητά της για δημιουργία νέων αποικιών και τελικά είναι αυτή που δίνει την σκυτάλη τη συνέχειας στην πρόοδο της νόσου. Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των όγκων, όπως επίσης και κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης, ο ρυθμός των κυτταρικών διαιρέσεων (και άρα του πλήθους των κυττάρων) είναι εκθετικός , αλλά η κατάσταση αυτή δεν έχει μεγάλη χρονική διάρκεια. Αν η διάρκεια της υψηλής ταχύτητας αναπαραγωγής ήταν μεγάλη, τότε η μαθηματική περιγραφή της όλης διαδικασίας θα αντιπροσωπευόταν από μια εκθετική συνάρτηση και η γραφική της παράσταση θα ήταν μια εκθετική καμπύλη.

Ωστόσο, με την αύξηση της μάζας του όγκου, ο χρόνος που απαιτείται για τον διπλασιασμό της επίσης αυξάνεται. Ο εκθετικός ρυθμός της ανάπτυξης αναχαιτίζεται με εκθετικό ρυθμό επιβράδυνσής της. Ο χρόνος διπλασιασμού του όγκου, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί ο όγκος μιας ορισμένης μάζας, αποτελεί ένα σύνθετο μέγεθος, το οποίο εξαρτάται από διάφορες εσωτερικές μεταβλητές, όπως είναι η χρονική διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, το ποσοστό των κυττάρων του πληθυσμού που υφίστανται διαίρεση και, φυσικά, από τον ρυθμό της απώλειας των κυττάρων από την συνολική μάζα.

Κύτταρα τα οποία δεν ευρίσκονται σε διαδικασία διαίρεσης, αλλά είναι βιώσιμα και ικανά προς αναπαραγωγή, όταν υπάρξουν οι κατάλληλες συνθήκες, λέγεται ότι ευρίσκονται σε φάση ηρεμίας ή διαφορετικά ότι έχουν σταθμεύσει στο σημείο G_0 της φάσεως G_1 του κυτταρικού κύκλου. Σε δεδομένο πληθυσμό, το ποσοστό των κυττάρων τα οποία ευρίσκονται σε κύκλο, δηλαδή σε ενεργό διαδικασία αναπαραγωγής, αποτελούν την λεγόμενη Δεξαμενή Πολλαπλασιασμού (ή κλάσμα αυξήσεως). Τα κύτταρα

αυτά μπορούν να σημανθούν με ραδιενεργό θυμιδίνη (δηλαδή θυμιδίνη η οποία περιέχει το ραδιενεργό ισότοπο του υδρογόνου Τρίτιο), η οποία ενσωματώνεται στο υπό σύνθεση DNA και έτσι, μέσω κατάλληλων νομογραμμάτων να υπολογιστεί ο αριθμός των υπό αναπαραγωγή κυττάρων. Ο πληθυσμός των εν λόγω κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στον ρυθμό αύξησης του κακοήθους όγκου. Έτσι, για μια δεδομένη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ένας όγκος ο οποίος εμφανίζει υψηλό κλάσμα αυξήσεως (Υψηλή Δεξαμενή Πολλαπλασιασμού) θα διπλασιαστεί ταχύτερα από έναν άλλο όγκο ίσου μεγέθους, αλλά με μικρότερο κλάσμα αυξήσεως, υπό τον όρο ότι η απώλεια κυττάρων (Νέκρωση, Απόπτωση, Μεταστάσεις) παραμένει αμετάβλητη μέσα στον χρόνο. Ο υψηλός ρυθμός απώλειας κυττάρων είναι υπεύθυνος για τον μεγάλο χρόνο διπλασιασμού τον οποίον εμφανίζουν όγκοι με υψηλό κλάσμα αυξήσεως.

Υπάρχουν πάρα πολλά δεδομένα που δείχνουν ότι, εκτός από τα κύτταρα τα οποία παραμένουν αδρανή στο σημείο ηρεμίας G_0 , ορισμένα καρκινικά κύτταρα, είτε από μόνα τους, είτε κατόπιν δράσεως επί αυτών μέσω διαφόρων φαρμάκων ή μέσω ιονιζουσών ακτινοβολιών μπορεί να καθλωθούν σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου και να αποκλειστούν να περάσουν στην φάση της κυτταροδιαίρεσης επί μεγάλα χρονικά διαστήματα. Επίσης η δράσεις των ιδίων παραγόντων είναι σε θέση να οδηγήσει μαζικά πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων στον θάνατο. Τα γεγονότα αυτά έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την επιλογή και τον προγραμματισμό της μεθόδου θεραπείας των συγκεκριμένων νεοπλασμάτων. Μολονότι η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι σχετικά σταθερή σε όγκους συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην διάρκεια του κύκλου διαφόρων φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών.

Η αποβολή κυττάρων εμφανίζεται αρκετά νωρίς κατά την αύξηση ενός όγκου. Μπορεί να θεωρηθεί ως δεδομένο ότι ακόμη και όγκοι μικρού μεγέθους (διαμέτρου 1 έως 2 mm) αρχίζουν και αποβάλλουν κύτταρα στους γειτονικούς ιστούς, παρά το ότι φαίνονται εντοπισμένοι. Το γεγονός ότι ορισμένοι καρκίνοι θεραπεύονται με τοπική μόνον θεραπεία, αποτελεί απόδειξη ότι πολλά από τα αποβαλλόμενα κύτταρα είτε δεν είναι βιώσιμα (δεν είναι κλωνογόνα), ή ότι καταστρέφονται από τον ξενιστή.

Ένας κακοήθης όγκος ο οποίος έχει διάμετρο 1 cm περιέχει ήδη 1×10^9 καρκινικά κύτταρα. Στο σχήμα αυτό διαφαίνεται το γεγονός ότι οι περισσότεροι κακοήθεις όγκοι ευρίσκονται στα τελευταία στάδια της καμπύλης της βιολογικής τους ανάπτυξης, έχουν αρχίσει να αποστέλλουν κύτταρα στους ιστούς του ξενιστή και απέχουν μόνον 10 έως δεκαπέντε διπλασιασμούς από το σημείο στο οποίο η συνολική τους μάζα καθίσταται θανατηφόρος για τον ξενιστή.

Η δράση των διαφόρων αντικαρκινικών μεθόδων θεραπείας περιγράφεται μέσω των καμπυλών δόσεως – ανταποκρίσεως και είναι εμφανής στις περιπτώσεις των αντικαρκινικών φαρμάκων και της ακτινοθεραπείας με ακτινοβολία Roentgen.

Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, μυκήτων ή βακτηρίων με φάρμακα ακολουθεί μια κινητική πρώτης τάξης. Μια δεδομένη δόση φαρμάκου (ανά Kg βάρους σώματος) φονεύει σταθερό κλάσμα κυττάρων κι όχι έναν σταθερό αριθμό αυτών. Δηλαδή εκείνη η θεραπευτική αγωγή που θα περιορίσει έναν κυτταρικό πληθυσμό ενός εκατομμυρίου σε 10 κύτταρα, θα περιορίσει πληθυσμό 100.000 κυττάρων σε 1 κύτταρο, ή πληθυσμό ενός δισεκατομμυρίου κυττάρων σε 10.000 κύτταρα.

Αν θεωρήσει κανείς ότι πολύ συχνά οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερες διαστάσεις (καθόσον ήδη αναφέραμε ότι ο όγκος του 1 cm, περιέχει 1 δισεκατομμύριο καρκινικά κύτταρα), αντιλαμβανόμαστε εύκολα ότι ο υπολειμματικός επιβιώνων πληθυσμός των καρκινικών κυττάρων, αν είναι κλωνογόνος μπορεί πολύ σύντομα να επαναφέρει το μέγεθος του όγκου στις αρχικές του διαστάσεις, κατόπιν μιας θεραπείας με το προαναφερθέν ποσοστό αποτελέσματος.

Το συμπέρασμα που εξάγεται από την κλασματική αυτή δράση εκ μέρους του χρησιμοποιούμενου κυτταροτοξικού παράγοντα είναι ότι, προκειμένου να έχουμε μια αποτελεσματική εκρίζωση του νεοπλασματικού πληθυσμού, απαιτείται η αύξηση της δόσης του, ή των αντινεοπλασματικών φαρμάκων, στα πλαίσια ανοχής του ξενιστή, ή, εναλλακτικά, η έναρξη της θεραπείας να λάβει χώρα όταν ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων είναι αρκετά μικρός, ώστε να επιτρέπεται η καταστροφή τους με λογικά ανεκτές δόσεις.

Πρέπει, στο σημείο αυτό, να συνυπολογίσουμε το γεγονός ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα, εμφανίζουν, όπως εξ άλλου και όλοι οι έμβιοι οργανισμοί, το φαινόμενο της ανάπτυξης αντοχής απέναντι σε οιονδήποτε κυτταροτοξικό παράγοντα, ειδικότερα όταν εκτεθούν σε αυτόν σε μικρές δόσεις.

Οι μηχανισμοί ανάπτυξης του φαινομένου της ανθεκτικότητας αναφέρθηκαν ανωτέρω. Συνεπώς είναι αναγκαίο η ένταση τόσο της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπείας να είναι αρκούντως μεγάλη ώστε να εκριζώσει τον καρκινικό πληθυσμό, ενώ από την άλλη πλευρά, η δράσεις της επί των υπόλοιπων κυττάρων του σώματος να μην έχει αντίστοιχα τοξικά αποτελέσματα, διότι τότε καταλήγουμε στην θανάτωση του ίδιου του οργανισμού που καλούμεθα να θεραπεύσουμε.

Η κυτταροτοξική ενέργεια των αντικαρκινικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων εμφανίζει σαφή εκλεκτικότητα για τα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού. Το κλινικό ανάλογο πολλών πειραμάτων σε καρκινοπαθή ζώα, στα οποία τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία σε διάφορα φάρμακα μπορεί να ερμηνεύσει και τα σημαντικά αποτελέσματα της δράσης των αντικαρκινικών αυτών παραγόντων στον άνθρωπο, χωρίς να επέρχεται παραλλήλως βαριά βλάβη στον γαστρεντερικό σωλήνα και τον μυελό των οστών.

Οι ίδιες αρχές που προαναφέραμε και το ίδιο σκεπτικό ισχύουν σε μεγάλη έκταση και για τις ακτινοθεραπείες με ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Το κλάσμα των κυττάρων που επιβιώνουν σε λογαριθμική κλίμακα, συσχετίζεται με την δόση της χορηγούμενης ακτινοβολίας Roentgen.

Στο εν λόγω διάγραμμα ορίζονται μερικά σημαντικά στοιχεία τα οποία αφορούν την ακτινοθεραπευτική παρέμβαση. Η δόση ακτινοβολίας η οποία καθιστά αδρανή προς αναπαραγωγή όλα τα κυτταρικά στοιχεία του συνολικού πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων ονομάζεται μέση θανατηφόρα δόση και συμβολίζεται ως D_0 .

Στο σημείο αυτό πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι όταν μια νεοπλασματική μάζα κυττάρων πλήττεται από μια δέσμη ιοντίζουσας ακτινοβολίας, τα φωτόνια υψηλής ενέργειας που διαπερνούν τα κύτταρα, δεν εμφανίζουν κάποια εκλεκτικότητα δράσης έναντι των βιολογικών στόχων τους αλλά τα αποτελέσματά τους διέπονται από την τυχαιότητα. Δηλαδή ένα μέρος

της βαλλόμενης ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας πλήττει κύτταρα τα οποία ήδη ευρίσκονται σε πορεία θανάτου, ένα άλλο μέρος χτυπά κύτταρα ήδη νεκρά, ένα τρίτο μέρος καταστρέφει κύτταρα με ενεργό αναπαραγωγικό δυναμικό, ενώ μια άλλη ποσότητα βιώσιμων και συνεπώς επικίνδυνων κυττάρων δεν πλήττεται καθόλου. Συνεπώς η κατανομή Poisson των δράσεων της ακτινοβολίας επί των καρκινικών κυττάρων δείχνει ότι αντί να έχουμε μια ολοκληρωτική καταστροφή των βιώσιμων κυττάρων του όγκου, τελικά καταστρέφεται μόνον το 63 % αυτών. Έτσι η δόση ακτινοβολίας που απαιτείται για την ελάττωση του αριθμού των κυττάρων ενός πληθυσμού στο ποσοστό του 37 % του αρχικού αριθμού τους, είναι ίση προς D_{37} , και αποτελεί τον λεγόμενο Δείκτη Ακτινοευαισθησίας.

Για τα περισσότερα είδη κυττάρων η τιμή αυτή κυμαίνεται μεταξύ 80 και 200 rad. Το κλάσμα των κυττάρων που επιβιώνει μετά την διαδοχική χορήγηση δύο μέσων θανατηφόρων δόσεων είναι ίσο προς 37X37 % ήτοι 13,69 %, ενώ μετά την επίδραση τριών μέσων θανατηφόρων δόσεων D_0 , είναι ίσο προς 5,1 % κ.ο.κ. Με μια αυστηρά εκθετική καμπύλη η D_0 ισούται προς την D_{37} . Ωστόσο, στην πραγματικότητα, η καμπύλη δόσης – αποτελέσματος δεν είναι ποτέ μια ακριβής ευθεία γραμμή, καθόσον στην αρχική της πορεία εμφανίζει ένα μικρό σχετικά επίπεδο διάστημα προτού καταστεί εκθετική. Αυτό το μικρό επίπεδο τμήμα αντιπροσωπεύει εκείνες τις δόσεις της ακτινοβολίας όπως επίσης και τις χαμηλότερες από αυτές στις οποίες, τα κύτταρα διατηρούν ακόμη την ικανότητα να επιδιορθώνουν αποτελεσματικά τις βλάβες τους τις προερχόμενες από την δράση των ιοντιζουσών ηλεκτρομαγνητικών ακτίνων. Φαίνεται ότι πάνω από αυτές τα συστήματα αυτοεπιδιόρθωσης των κυττάρων υφίστανται κάμψη οπότε ενσκήπτει εκθετικά πλέον ο θάνατος. Η δόση που αντιστοιχεί σε εκείνο το σημείο στο οποίο η καμπύλη γίνεται εκθετική (D_q) είναι η λεγόμενη δόση ουδού. Υπολογίζεται ότι η αποκατάσταση της βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάστημα δύο ωρών. Ο ακριβής προσδιορισμός των D_q , D_0 , D_{37} , του χρόνου αποκατάστασης της βλάβης και των μηχανισμών επιδιόρθωσής της έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την κλινική κλασμάτωση των δόσεων, ειδικά εκεί όπου χρησιμοποιείται ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας.

Για καθαρά κλινικούς σκοπούς είναι σημαντικό να κατασκευάζεται μια ακριβής καμπύλη δόσεως – ανταποκρίσεως προκειμένου να προγραμματίζεται με αυστηρότητα το σύνολο των δόσεων ακτινοβολίας που χορηγούμενο με την κατάλληλη χρονική συχνότητα μπορεί να εξουδετερώσει πλήρως το αναπαραγωγικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, ειδικότερα για όγκους που δεν είναι συνηθισμένοι. Προφανώς η εξατομίκευση της ακτινοθεραπείας είναι πάρα πολύ σημαντική και πρέπει να επιχειρείται παρά την εγγενή της δυσκολία.

IV. ΦΑΡΜΑΚΑ, ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Μέχρι την έναρξη της δεκαετίας του '80, βρέθηκαν περισσότεροι από 40 σημαντικοί αντινεοπλασματικοί παράγοντες και 25 φάρμακα για την θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου εισήλθαν στην φαρμακευτική αγορά.

Από το 1980 και κατόπιν η εκρηκτική πρόοδος των βιοϊατρικών επιστημών δημιούργησε τις προοπτικές μιας πολύ μεγάλης στροφής στην θεραπευτική των νεοπλασματικών παθήσεων και η παθοφυσιολογία του καρκίνου θεωρείται σήμερα ένας επιστημονικός τομέας πάρα πολύ βαθιά μελετημένος. Ωστόσο, παρά τις τόσο μεγάλες και ριζικές τομές που η εξειδικευμένη αντικαρκινική έρευνα δημιούργησε, εν τούτοις οι βασικές θεραπευτικές κατευθύνσεις δεν φαίνεται να έχουν μεταβληθεί ουσιαστικά από το 1980 και εντεύθεν. Τα αίτια αυτής της καθυστέρησης είναι πολλαπλά και εκφεύγουν από την ανάλυση της παρούσας εργασίας.

Συνολικά στο φαρμακευτικό εμπόριο το σχετικό με την θεραπευτική του καρκίνου διατίθενται έξι κατηγορίες αντινεοπλασματικών παραγόντων καθώς και μια σειρά άλλων φαρμάκων, όπως αλκυλιωτικοί παράγοντες, αντιμεταβολίτες, αντιβιοτικά, ενδοκρινικά φάρμακα, αλκαλοειδή φυτικής προέλευσης, κυτταροτοξικά τερπενοειδή, αντιοξειδωτικοί παράγοντες και ανοσολογικοί διεγέρτες. Επίσης υπάρχουν εμβόλια για τον καρκίνο.

Στις σελίδες που ακολουθούν, γίνεται μια επί τροχάδην αναφορά των χρησιμοποιούμενων κύριων αντικαρκινικών παραγόντων, όπως επίσης και μικρές αναφορές επί των θεωρούμενων μηχανισμών δράσης τους.

A. Αλκυλιωτικοί παράγοντες

Οι πρώτες μελέτες για την αντικαρκινική δράση των εν λόγω παραγόντων ξεκίνησαν περί τα τέλη της δεκαετίας του 1920 από τον Beremblum οι οποίοι παρατήρησαν ότι το χημικό όπλο γνωστό με το όνομα «αέριο της μουστάρδας» προκαλούσε ελάττωση των λευκοκυττάρων, ή και απλασία του μυελού των οστών στους ανθρώπους που είχαν εκτεθεί σε αυτό, κατόπιν μιας επίθεσης των γερμανικών στρατευμάτων στην πόλη του Ύπρ της Γαλλίας. Οι ουσίες αυτές ονομάστηκαν Υπερίτες.

Ο Beremblum δοκίμασε τις δράσεις της μεχλωραιθαμίνης (ενεργού συστατικού του αερίου της μουστάρδας) σε λευχαιμικούς ασθενείς και βρήκε ότι η μείωση των ανώμαλων λευκοκυττάρων υπήρξε ραγδαία. Συνεπώς η μεχλωραιθαμίνη αποτέλεσε τον πρώτο χημικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε ιστορικά στην θεραπεία του καρκίνου. Διαπιστώθηκε ότι εξασκεί μεγάλη δράση στα λεμφώματα. Η μεχλωραιθαμίνη περιέχει δύο ομάδες βήτα χλωροαιθυλίου οι οποίες μεταφέρονται σε θετικά φορτισμένα παράγωγα του αιθυλενιμονίου και συνδέονται με τις αρνητικά φορτισμένες ρίζες της γουανίνης των συμπληρωματικών ελίκων του DNA με αποτέλεσμα την δημιουργία διασταυρούμενων συνδέσεων. Η μεχλωραιθαμίνη, υποβλήθηκε κατόπιν, ως μόριο, σε τρεις σημαντικές τροποποιήσεις, με σκοπό την μεταβολή των χημικών της ιδιοτήτων προκειμένου η δράση της να είναι διαρκέστερη, λιγότερο τοξική και περισσότερο στοχευμένη. Έτσι η αντικατάσταση επί του ατόμου του αζώτου με ηλεκτρόφιλες ομάδες, όπως συμβαίνει στην χλωραμβουκίλη, ελαχιστοποιεί την δραστηριότητα του μορίου με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μορίου χημικώς σταθερότερου, με μεγαλύτερη διάρκεια ημιζωής και συνεπώς επιμήκυνση του χρόνου δράσης του στο εσωτερικό του οργανισμού. Η προσθήκη στο άτομο του αζώτου ενός αμινοξέος – το οποίο ενεργεί ως μεταφορέας – είναι δυνατόν να αυξηθεί η ενσωμάτωση του φαρμάκου σε σημεία του οργανισμού στα οποία υπάρχει υψηλή πρωτεϊνοσυνθετική δραστηριότητα και συνεπώς να στοχευτούν σχετικά καλύτερα τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν έντονη πρωτεϊνοσύνθεση. Ένα παράγωγο της μεχλωραιθαμίνης με τέτοιον χαρακτήρα αντιπροσωπεύεται από την μελφαλάνη, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως ανάλογο της L – φαινυλαλανίνης. Η προσθήκη μιας κυκλικής ομάδας στο άτομο του αζώτου, αντικαθιστά τις πολύ ενεργείς ομάδες των

χλωροαιθυλίων, δίνοντας ένα μόριο ηπιώτερης δράσης, την κυκλοφωσφαμίδη. Γενικά ο τύπος αυτού του φαρμάκου δεν είναι εκ των προτέρων ενεργός, δηλαδή η ουσία που το αποτελεί δεν είναι αυτή η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τα καρκινικά κύτταρα.

Τα φάρμακα αυτά, για να καταστούν δραστικά, πρέπει να ενεργοποιηθούν στο σύστημα του κυτοχρώμου P – 450, στα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων, οπότε δημιουργούνται ενδιάμεσοι μεταβολίτες οι οποίοι τελικά είναι υπεύθυνοι για την βλάβη των καρκινικών κυττάρων. Από τα δεδομένα που υπάρχουν φαίνεται ότι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες δρουν όλοι τους σε ένα ενιαίο πλαίσιο και δεν δεικνύουν εκλεκτικότητα για κάποια από τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο φαίνεται ότι η δράσεις τους είναι σαφώς εντονότερες στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερη ευπάθεια όταν εκτεθούν στις εν λόγω ουσίες.

Αυτό σημαίνει ότι οι δράσεις τους στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή κατά την σύνθεση του DNA είναι πιο ισχυρές, καθόσον η στιγμή της αναπαραγωγής της διπλής έλικας ευρίσκει το DNA ξεδιπλωμένο, πιο ανοιχτό και συνεπώς με μεγαλύτερη εκτεθειμένη επιφάνεια, οπότε η αλκυλίωση των γουανινών μπορεί να γίνει ποσοτικότερη και οι βλάβες πολύ μεγαλύτερες.

Αν αυτό ισχύει για τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία αναπαράγονται ενεργά, ισχύει επίσης και για τους άλλους ιστούς του σώματος, οι οποίοι εμφανίζουν διαρκή ενεργό αναπαραγωγή, όπως τα κύτταρα του μυελού των οστών, οι βλεννογόνοι και τα κύτταρα του δέρματος . Παρά το γεγονός ότι το πλαίσιο δράσης των αλκυλιωτικών παραγόντων είναι ενοποιημένο, και προϋποθέτει την μικροσωματική τους ενεργοποίηση, εν τούτοις τα διάφορα παράγωγά τους εμφανίζουν μερικές διαφορές, οι οποίες είναι χρήσιμες για την εκλεκτική εφαρμογή των φαρμάκων αυτών σε συγκεκριμένους καρκίνους.

Οι διαφορές αυτές έχουν αδρά ως εξής:

1^ο) Η κυκλοφωσφαμίδη αντιπροσωπεύει τον μοναδικό αλκυλιωτικό παράγοντα, ο οποίος είναι σε θέση να προκαλέσει πλήρη υποχώρηση της οξείας λευχαιμίας, αλλά και διατήρηση του θεραπευτικού αποτελέσματος. Επίσης η κυκλοφωσφαμίδη δρα επί του μικροκυτταρικού καρκίνου των

πνευμόνων, με την χαρακτηριστική, ως σπόρων βρώμης, κυτταρική μορφολογία, ενώ ο υπερίτης δεν είναι δραστικός. .

2^{ον}) Η μελφαλάνη, καθώς επίσης και η κυκλοφωσφαμίδη, αποτελούν τους πλέον αποτελεσματικούς παράγοντες για την θεραπεία του μυελώματος.

3^{ον}) Η βουσουλφάνη ασκεί την ισχυρότερη δράση της επί της μυελογενούς λευχαιμίας και επί της διαδικασίας αναπαραγωγής των κοκκιοκυττάρων του αίματος.

4^{ον}) Η χλωραμβουκίλη δρα ιδιαιτέρως αποτελεσματικά στην λεμφοκυτταρική λευχαιμία και στην λεμφοκυτταροποίηση.

Τα δεδομένα τα οποία αναφέρονται στη θεραπευτική των κακοηθών όγκων σε συνάρτηση με την βιολογία του καρκίνου, καθώς επίσης και τα δεδομένα που αφορούν τους αλκυλιωτικούς παράγοντες, έχουν ληφθεί από τις ακόλουθες βιβλιογραφικές παραπομπές: 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307.

B. Αντιμεταβολίτες

Οι αντιμεταβολίτες ορίζονται σαν ουσίες οι οποίες έχουν την ιδιότητα να ομοιάζουν δομικά σε υψηλό ποσοστό με έναν φυσιολογικό μεταβολίτη , με αποτέλεσμα να εισέρχονται στους μεταβολικούς κύκλους στους οποίους αυτός συμμετέχει προκαλώντας συχνά διαταραχές στην εξέλιξη μιας μεταβολικής πορείας είτε ανταγωνιζόμενοι την κατάληψη του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου, είτε δημιουργώντας προϊόντα τοξικά για την επιβίωση του κυττάρου στο οποίο ενσωματώνονται.

Μερικοί από τους πλέον χρησιμοποιούμενους γνωστούς αντιμεταβολίτες στην θεραπευτική του καρκίνου είναι οι κάτωθι:

1^{ον}) Φθοριουρακίλη

2^{ον}) Μεθοτρεξάτη

3^{ον}) 6- μερκαπτοπουρίνη

4^{ον}) 6 – θειογουανίνη

5^{ον}) Αραβινοσυλο – κυτοσίνη

Ο βασικός λειτουργικός στόχος της δράσης των αντιμεταβολιτών αντιπροσωπεύεται από την φάση S του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή την φάση

σύνθεσης του DNA. Ορισμένοι επιδρούν άμεσα στην σύνθεση του DNA, όπως π.χ. η Αραβινοσυλο – κυτοσίνη ασκούν άμεση δράση ενώ άλλοι, όπως η μεθοτρεξάτη παρεμποδίζουν την είσοδο των κυττάρων στην φάση σύνθεσης του DNA.

B.1. Ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος

Το φυλλικό οξύ είναι μια βιταμίνη του συμπλέγματος Β και απαραίτητος παράγοντας για την ανθρώπινη διατροφή. Το φυλλικό οξύ κατά τον μεταβολισμό του, ανάγεται από το ένζυμο αναγωγή του διϋδροφυλλικού οξέος σε διϋδροφυλλικό και σε τετραϋδροφυλλικό οξύ. Το τελευταίο αυτό μόριο δέχεται κατόπιν ομάδες με ένα άτομο άνθρακα και σχηματίζει το λεγόμενο συνένζυμο φυλλινικό οξύ. Αναλόγως με τον τύπο της οξειδωσης του άνθρακα του μορίου είναι δυνατόν να προκύψουν διάφοροι τύποι συνενζύμου φυλλινικού οξέος. Ένας τύπος από τα εν λόγω συνένζυμα, το λεγόμενο N¹⁰ - φορμυλτετραϋδροφυλλικό οξύ αποδίδει ένα μονοκαρβονικό τμήμα για τον σχηματισμό της μονοφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης, η οποία αποτελεί πρόδρομη ουσία που συμμετέχει στην σύνθεση του DNA. Υπάρχει ένας αντιμεταβολίτης του φυλλικού οξέος, η μεθοτρεξάτη, ο οποίος ανταγωνίζεται το φυλλικό οξύ για την σύνθεση της θυμιδίνης και κατά συνέπεια, για την σύνθεση του DNA, με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Η μεθοτρεξάτη ήταν ο πρώτος αντιμεταβολίτης που ετέθη σε κλινική μελέτη περί τα τέλη της δεκαετίας του 1950. Υπάρχουν ορισμένοι ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος, οι οποίοι έχουν χημική συγγένεια με το ενεργό κέντρο της αναγωγής του διϋδροφυλλικού οξέος, έως και 10.000 φορές μεγαλύτερη εν συγκρίσει με την αντίστοιχη του φυλλικού οξέος. Η χορήγηση του φυλλινικού οξέος, το οποίο αποτελεί και το προϊόν των σχετικών αντιδράσεων, αναστέλλει τις δράσεις του ανταγωνιστή και συνεπώς χρησιμοποιείται ως αντίδοτο των αντιμεταβολιτών αυτού του τύπου. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι οι δρομολογημένες δράσεις των ανταγωνιστών του φυλλικού οξέος, δηλαδή η ελάττωση της σύνθεσης της θυμιδίνης, όταν έχει αρχίσει να επιτελείται, δεν αναστέλλεται και συνεπώς και η αντίστοιχη σύνθεση του DNA. Η χορήγηση του φυλλινικού οξέος θα ελαττώσει τις δράσεις του αντιμεταβολίτη στην όλη αλυσίδα των αντιδράσεων από το χρονικό σημείο της χορήγησής του και κατόπιν. Η μεθοτρεξάτη μας δίνει ένα κλασσικό παράδειγμα για την υφιστάμενη σχέση

του μηχανισμού της δράσης ενός αντικαρκινικού παράγοντα με την αντίστοιχη τοξικότητά του: Η δράση του παράγοντα αυτού συνίσταται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA και συνεπώς, γίνεται εμφανής μόνο στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται. Κατά τον τρόπο αυτό η τοξικότητά του εντοπίζεται, κατά κύριο λόγο στον γαστρεντερικό σωλήνα, το δέρμα, καθώς και στον μυελό των οστών.

B.2. Ανάλογα των πυριμιδινών

Δύο σημαντικοί παράγοντες που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην χημειοθεραπεία του καρκίνου είναι η 5-φθοριο-ουρακίλη (ανάλογο της ουρακίλης) και η αραβινοσυλο – κυτοσίνη (ανάλογο της κυτοσίνης).

Ο μηχανισμός της δράσης της 5-φθοριουρακίλης είναι ο ακόλουθος: Η 5-φθοριουρακίλη μετατρέπεται στην ενεργό ουσία μονοφωσφορική 5-φθοριοδεοξουριδίνη, η οποία αναστέλλει το ένζυμο συνθετάση του θυμιδυλικού οξέος. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αναστολή της μεθυλίωσης της μονοφωσφορικής δεοξουριδίνης σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη, η οποία είναι άμεσος πρόδρομος της σύνθεσης του DNA, οπότε με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την τελική σύνθεση του DNA . Ακόμη η 5-φθοριουρακίλη ενσωματώνεται μέσα στο RNA και παρεμποδίζει την ένταξη της ουρακίλης, όπως επίσης και του οροτικού οξέος.

Η συνέπεια των γεγονότων αυτών είναι η άμεση αναστολή της συνθέσεως του RNA. Δεδομένου ότι η συμπληρωματική έλικα του DNA ξεκινά την σύνθεσή της τμηματικά μέσω της σύνθεσης ενός μικρού τεμαχίου RNA, παρακωλύεται η σύνθεση της. Επίσης παρακωλύεται η σύνθεση του mRNA, του rRNA και του tRNA με αποτέλεσμα να έχουμε μια ισχυρή αναστολή του μηχανισμού πρωτεϊνοσύνθεσης σε τρία ταυτοχρόνως επίπεδα. Η 5-φθοριουρακίλη έχει κλινικώς δειχθεί ότι αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο φάρμακο για την αντιμετώπιση των καρκίνων του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως επίσης και του μαστού. Υπάρχει μια πολύ καλή συνέργια της 5-φθοριουρακίλης με το ασκορβικό οξύ.

Η αραβινοσυλο – κυτοσίνη είναι ένα ανάλογο της δεοξυκυτοσίνης, με διαφορά στο σάκχαρο που ευρίσκεται συνδεδεμένο με το νουκλεοτίδιο και όχι στην αζωτούχο βάση του. Εξ αιτίας του συγκεκριμένου του χαρακτηριστικού αποτελεί έναν αξιόλογο αναστολέα της πολυμεράσης του DNA και συνεπώς

και της σύνθεσης του DNA. Εξ αιτίας της δομικής της ομοιότητας ανταγωνίζεται την δεοξυκυτιδίνη για την κατάληψη του ενεργού κέντρου του ενζύμου κινάση της δεοξυκυτιδίνης. Οι δράσεις της ασκούνται μόνον κατά την φάση της σύνθεσης του DNA στον κυτταρικό κύκλο. Η αραβινοσυλο – κυτοσίνη μεταβολίζεται σε ουρακιλο – αραβινοσίδη από μια απαμινάση και απεκκρίνεται υπό αυτήν την μορφή από τα ούρα.. Υπάρχουν κάποια δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι η σχέση μεταξύ της κινάσης της δεοξυκυτιδίνης και της εν λόγω απαμινάσης, συσχετίζεται με τον βαθμό της αποτελεσματικότητας της αραβινοσυλο – κυτοσίνης. Το φάρμακο αυτό έχει κύρια ένδειξη στην θεραπεία της οξείας λευχαιμίας, καθώς η μεγαλύτερη δράση του εντοπίζεται εκεί. Από σειρές πειραμάτων σε ζώα, αλλά και από τα δεδομένα των κλινικών μελετών φαίνεται ότι η αντικαρκινική και η τοξική δράση του εν λόγω φαρμάκου επηρεάζεται από το σχήμα χορήγησης. Το μεγάλο πλεονέκτημα της αραβινοσυλο – κυτοσίνης είναι ότι η βαριά τοξικότητά του περιορίζεται μόνο στην καταστολή του μυελού των οστών.

B.3. Ανάλογα των πουρινών

Η 6-μερκαπτοπουρίνη αποτελεί έναν πολύ γνωστό αντιμεταβολίτη , ο οποίος είναι δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και συνεπώς είναι δυνατόν να εισέλθει στην μεταβολική σειρά βιοσύνθεσης των πουρινικών βάσεων του DNA. Το ένζυμο πυροφωσφορυλάση του ινοσινικού οξέος μετατρέπει την 6-μερκαπτοπουρίνη σε ριβοφωσφορική 6-μερκαπτοπουρίνη και υπό την μορφή αυτού του ενεργού νουκλεοτιδίου, ο εν λόγω αντιμεταβολίτης εισέρχεται σε διάφορες βαθμίδες της σύνθεσης των πουρινών. Έτσι αναστέλλει την μετατροπή του μονοφωσφορικού ινοσινικού οξέος σε μονοφωσφορική ξανθίνη και σε μονοφωσφορική αδενοσίνη. Επίσης μειώνει σημαντικά την σύνθεση της 5-φωσφοριβοσυλαμίνης, η οποία αντιπροσωπεύει την πρώτη βαθμίδα της βιοσύνθεσης των πουρινών, ενεργώντας μέσω ψευδούς μίμησης μιας ανατροφοδοτικής αναστολής. Η 6-μερκαπτοπουρίνη μεταβολίζεται σε 6-θειουρικό οξύ από την ξανθινοξειδάση. Η αλλοπουρινόλη, η οποία αποτελεί αναστολέα της ξανθινοξειδάσης και χρησιμοποιείται για την αναστολή της σύνθεσης του ουρικού οξέος, μειώνοντας την δράση του συγκεκριμένου ενζύμου, μειώνει επίσης και τον τελικό μεταβολισμό της 6-μερκαπτοπουρίνης. Συνεπώς, στις περιπτώσεις που υπάρχει ταυτόχρονη χρησιμοποίηση

αλλοπουρινόλης η δόση της 6-μερκαπτοπουρίνης πρέπει να μειώνεται στο 30 % της δόσης που χορηγείται απουσία του αναστολέα της ξανθοξειδάσης. Η κύρια ένδειξη του φαρμάκου αυτού είναι η ένταξή του σε συνδυαστικά σχήματα για την αντιμετώπιση της οξείας λευχαιμίας. Ένας ανάλογος αντιμεταβολίτης είναι η 6-θειογουανίνη, η οποία έχει παρόμοια δραστηριότητα και παρόμοια τοξικότητα με την 6-μερκαπτοπουρίνη αλλά δεν μεταβολίζεται από την ξανθοξειδάση και συνεπώς δεν επηρεάζεται από την χορήγηση της αλλοπουρινόλης (308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315).

Γ. Φυτικά αλκαλοειδή

Το φαρμακευτικό φυτό *Vinca rosea* συνθέτει τέσσερα εκ των οποίων τα δύο, η βινκριστίνη και η βινβλαστίνη, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τόσο στο πειραματικό όσο και στο κλινικό πεδίο. Περί τα τέλη της δεκαετίας του 1970 εισήλθε σε φάση κλινικού πειραματισμού και ένα άλλο αλκαλοειδές, η βιντεσίνη. Τα αλκαλοειδή αυτά ασκούν εξειδικευμένη δράση στον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα προκαλούν αναστολή της μετάφρασης σε κύτταρα που υφίστανται διαίρεση.

Οι εν λόγω ουσίες συνδέονται με την πρωτεΐνη τουμπουλίνη, η οποία αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των μικροσωληνίσκων του κυττάρου και συνεπώς εμποδίζουν τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου με συνέπεια την αναστολή της μετακίνησης των χρωματοσωμάτων και την αναστολή της κυτταροδιαίρεσης. Οι δομικές ομοιότητες φαίνεται ότι αποτελούν την βάση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων των δύο αλκαλοειδών. Η βινκριστίνη διαφέρει από την βινβλαστίνη δομικά διότι μια μεθυλική ομάδα της δεύτερης έχει αντικατασταθεί από μια φορμυλική ομάδα. Παρά το γεγονός της ομοιότητας των δράσεών τους, υπάρχουν, εν τούτοις, και αξιόλογες διαφορές: Η βινκριστίνη μπορεί να προκαλέσει πλήρη αποδρομή της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, ενώ η βινβλαστίνη δεν παράγει αυτό το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η βινκριστίνη επίσης υπερέχει από την βινβλαστίνη στην κυτταροστατική της δράση επί των λεμφοκυτταρικών και ιστιοκυτταρικών λεμφωμάτων.

Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι και τα δύο αυτά αλκαλοειδή είναι εξ ίσου αποτελεσματικά στην νόσο του Hodgkin. Φαίνεται ότι οι διαφορές των δράσεων των δύο παραγόντων, οι διαφορές στην τοξικότητα, όπως επίσης

και η απουσία ανάπτυξης διασταυρούμενης ανθεκτικότητας σχετίζονται με μια εκλεκτικότητα των δύο ουσιών να εισέρχονται ευκολότερα σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Η αναστολή της μετάφρασης που προκαλούν επάγει έναν ορισμένο συγχρονισμό του στοχευόμενου κυτταρικού πληθυσμού, με αποτέλεσμα η ακόλουθη έκθεσή του σε παράγοντες που αναστέλλουν την φάση S να μεγεθύνει το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα.

Το 1972 απομονώθηκε ένα ακόμη αλκαλοειδές, η μαΐτανσίνη, το οποίο εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες οφειλόμενες σε έναν μηχανισμό απολύτως όμοιο με εκείνο των αλκαλοειδών της *Vinca*. Η τοξικότητα της βινβλαστίνης φαίνεται να είναι μικρότερη της βινκριστίνης (316, 317, 318, 319, 320, 321, 322).

Δ. Αντινεοπλασματικά αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες οι οποίες παράγονται από βιολογικούς οργανισμούς (κατά κύριο λόγο μύκητες) και επιδρούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη άλλων οργανισμών, οι οποίοι διεκδικούν με αυτούς τον ίδιο ζωτικό χώρο. Υπάρχουν πολλοί αντιβιοτικοί παράγοντες με αντινεοπλασματικές ιδιότητες οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι οι εξής: η δακτυνομυκίνη (ακτινομυκίνη D), η μιθραμυκίνη, η αδριαμυκίνη (ή δοξορουβικίνη), η δαουνορουβικίνη (ή δαουνομυκίνη) και η μπλεομυκίνη.

Η δακτυνομυκίνη αποτέλεσε το πρώτο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στην χημειοθεραπεία των νεοπλασματικών νόσων. Δεν εμφανίζει ειδική δράση επί του κυτταρικού κύκλου αλλά φαίνεται ότι σχηματίζει σύμπλεγμα με το DNA και αναστέλλει την μεταγραφή του DNA σε RNA, πλήττοντας έτσι την σύνθεση των πρωτεϊνών. Η χρήση του εμφανίζει σημαντική αποτελεσματικότητα στους όγκους της παιδικής ηλικίας, όπως στον όγκο του Wilms, το ραβδομυοσάρκωμα, το νευροβλάστωμα και τους τροφοβλαστικούς όγκους των γυναικών.

Η μιθραμυκίνη έχει αντινεοπλασματική δράση περιορισμένου εύρους και αντιμετωπίζει κυρίως τους όγκους του όρχεως από εμβρυακά κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης του φαίνεται ότι έγκειται στην δημιουργία συμπλεγμάτων των μορίων του με το DNA και ακολούθως παρακώλυση της σύνθεσης του RNA της εξαρτώμενης από το DNA. Συνήθως τα νεοπλάσματα, εξ αιτίας της παραγωγής πρασταγλανδίνης E2 εκ μέρους των κυττάρων τους, δημιουργούν

στον καρκινοπαθή οργανισμό υπερασβεστιαμία, η οποία κατόπιν λειτουργεί ως διεγέρτης ποικίλων ανώμαλων δευτεροπαθών αντιδράσεων. Ως γνωστόν, το ασβέστιο αποτελεί έναν διαμεσολαβητή 2^{ου} τύπου που ενεργοποιεί την κινητοποίηση ενός πολύ μεγάλου φάσματος ενδοκυττάρων διεργασιών, οι οποίες μπορεί να είναι και μοιραίες για τα φυσιολογικά κύτταρα.

Η μιθραμυκίνη έχει την ιδιότητα να μειώνει τα επίπεδα του ασβεστίου στο αιματικό πλάσμα των καρκινοπαθών, ενδεχομένως αναστέλλοντας την απελευθέρωση του ιόντος αυτού από τα οστά των ασθενών. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της αναστολής δεν είναι γνωστός, αλλά η χορήγηση της μπορεί να είναι ευεργετική για την αντιμετώπιση της υπερασβεστιαμίας εκ της νεοπλασματικής νόσου. Μέσα στο πλαίσιο των τοξικών παρενεργειών πρέπει να υπογραμμιστεί η κατασταλτική επίδραση που ασκεί στον μυελό των οστών, η οποία, πολύ συχνά, οδηγεί σε θρομβοκυτταροπενία. Επί πλέον η μιθραμυκίνη έχει ως παρενέργεια την εκδήλωση μιας οξείας αιμορραγικής διάθεσης, άγνωστης αιτιολογίας, η οποία μπορεί να αποβεί θανατηφόρος στο 5% των ασθενών όταν αυτοί λαμβάνουν πλήρεις θεραπευτικές δόσεις.

Η αδριαμυκίνη και η δαφνορουβικίνη είναι αντιβιοτικές ουσίες οι οποίες παράγονται από τον μεταβολισμό του μύκητα *Streptomyces*, ανήκουν στην κατηγορία των ανθρακυκλινών και αντιπροσωπεύουν δύο από τις σημαντικότερες αντινεοπλασματικές ουσίες με μεγάλη κλινική και πειραματική εφαρμογή. Οι δύο αυτοί παράγοντες εμφανίζουν ως μόρια μεγάλες δομικές ομοιότητες, η κυριότερη των οποίων είναι η ύπαρξη τεσσάρων γειτονικών εξαμελών κύκλων ανθράκων, εκ των οποίων οι τρεις πρώτοι είναι βενζολικού χαρακτήρα, ενώ ο τελευταίος έχει υποστεί προσθήκες και δεν εμφανίζει διπλούς δεσμούς.

Οι τρεις ακόρεστοι δακτύλιοι αποτελούν ένα ανθρακένιο κι φέρνουν στον κεντρικό δακτύλιο στις θέσεις 1 και 4 δύο κετονικά οξυγόνα. Στον τέταρτο άνθρακα του πρώτου δακτυλίου του ανθρακενίου υπάρχει μια μεθοξυλική ομάδα, ενώ στον τρίτο ακραίο δακτύλιο του ανθρακενίου, επί των ανθράκων 1 και 4 υπάρχουν δύο υδροξυλικές ρίζες. Στον τέταρτο κεκορεσμένο δακτύλιο τα υδρογόνα της θέσης 2 έχουν υποκατασταθεί από έναν μεθυαιθέρα για την μεν δαουνορουβινίνη και από μια αιθαιρική αλκοόλη για την αδριαμυκίνη.

Αμφότερες οι ουσίες στην θέση 4 του κεκορεσμένου δακτυλίου έχουν γλυκοζυλιωθεί.

Ο μηχανισμός δράσης των δύο αυτών ανθρακυκλινών συνίσταται στο να τίθενται ενδιάμεσως των δύο ελίκων του DNA, εμποδίζοντας τον σχηματισμό γεφυρών υδρογόνου μεταξύ των απέναντι συμπληρωματικών του βάσεων. Αυτού του είδους η διασάλευση της γεωμετρίας της διπλής έλικας, εμποδίζει τόσο τον αναδιπλασιασμό του DNA, όσο και την μεταγραφή αυτού στις διάφορες μορφές RNA, οπότε πλήττεται τόσο η αναπαραγωγή του γενετικού υλικού όσο και η εξαρτώμενη από αυτό σύνθεση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Όπως θα περιμέναμε από οποιαδήποτε ουσία που εμποδίζει την λειτουργία του DNA, οι βασικές κυτταροτοξικές δράσεις των δύο αυτών σημαντικών ανθρακυκλινών, εντοπίζονται, κατά κύριο λόγο, στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Και οι δύο ουσίες εμφανίζουν, συνεπώς, κυτταροτοξικές δράσεις σε ένα ευρύ φάσμα νεοπλασμάτων τόσο του ανθρώπου, όσο και των ζώων. Η αδριαμυκίνη εμφανίζει ευρύτερο φάσμα αντικαρκινικών δράσεων, παρά το γεγονός ότι η μόνη της δομική διαφορά με την δαουνορουβικίνη συνίσταται στην ύπαρξη μιας υδροξυλικής ομάδας. Η αδριαμυκίνη εμφανίζει διπλάσιο θεραπευτικό δείκτη από την δαουνορουβικίνη στους όγκους των ζώων, ενώ είναι αποτελεσματική σε πολλά νεοπλάσματα του ανθρώπου, στα οποία εμπεριέχονται οι κακοήθεις όγκοι του μαστού, του θυρεοειδούς αδένα, σαρκώματα των οστών και των μαλακών μορίων, λεμφώματα Hodgkin καθώς και λεμφώματα non Hodgkin. Η δαουνορουβικίνη χρησιμοποιείται με επιτυχία στις οξείες λευχαιμίες των ενηλίκων. Μια σημαντική παρενέργεια των δύο αυτών ουσιών αντιπροσωπεύεται από την τοξική της δράση στο μυοκάρδιο, η οποία μπορεί να φτάσει μέχρι και το επίπεδο της καρδιακής ανεπάρκειας. Ωστόσο η καρδιακή ανεπάρκεια που προκαλούν οι ανθρακυκλίνες είναι συχνά αναστρέψιμη. Η καρδιοτοξικότητα των δύο φαρμάκων σχετίζεται με την δόση τους και ο κίνδυνος εμφάνισής της είναι πολύ μεγαλύτερος σε ηλικιωμένα άτομα.

Η μπλεομυκίνη είναι επίσης ένα άλλο αντιβιοτικό με σημαντικές αντινεοπλασματικές ιδιότητες, το οποίο απομονώθηκε από καλλιέργειες του *Streptomyces*. Στην πραγματικότητα δεν πρόκειται περί μιας μόνον ουσίας αλλά περί ενός πολύπλοκου συμπλέγματος γλυκοπεπτιδίων (τουλάχιστον επτά), τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την δομή του αμινοτελικού

τους άκρου. Το κυρίαρχο συστατικό και ενδεχομένως το περισσότερο δραστικό, αντιπροσωπεύεται από την μπλεομυκίνη A_2 , η οποία αποτελεί περί το 60% του πολυπεπτιδικού μίγματος. Η αντινεοπλασματική δράση της μπλεομυκίνης σχετίζεται με την ικανότητά της να προκαλεί διάσχιση των αλυσίδων του DNA, όπως επίσης και θραύσεις αυτού. Υπό την δράση της μπλεομυκίνης τα κύτταρα σταματούν στο ενδομιτωτικό διάστημα και εμφανίζουν τοιουτοτρόπως συγχρονισμό. Σε χαμηλή συγκέντρωση η μπλεομυκίνη αναστέλλει την κυτταροδιαίρεση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναστέλλει την σύνθεση του DNA. Το φάρμακο αυτό παρουσιάζει ισχυρές δράσεις στους καρκίνους της κεφαλής και του λαιμού, του πέους, των όρχεων και του δέρματος, ενώ επίσης είναι δραστική και στα λεμφώματα εν γένει. Η δραστηριότητά της έναντι των νεοπλασμάτων των επιθηλιακών ιστών πιθανόν συσχετίζεται με την εγγενή αδυναμία των κυττάρων τους να αποικοδομούν τις γλυκοπρωτεΐνες του συμπλέγματος της μπλεομυκίνης σε αδρανείς μεταβολίτες. Η ανταπόκριση στην μπλεομυκίνη είναι, κατά κανόνα, βραχυπρόθεσμες και διαρκούν μόνον περί τις έξι έως δώδεκα εβδομάδες. Η τοξικότητά της εμποδίζει την μακροπρόθεσμη θεραπεία συντήρησης. Σημειωτέον ότι η συνεχής έγχυσή της προκαλεί διέλευση του φαρμάκου από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και ακολούθως νευροτοξικότητα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της τοξικότητας των εν λόγω παραγόντων συνίσταται στο ότι εμφανίζουν μυελοτοξικότητα, συνήθως 3 ή τέσσερις εβδομάδες μετά την θεραπευτική τους χορήγηση. Η παρενέργεια αυτή είναι, ωστόσο, μη συνηθισμένη.

Γενικά οι αντιβιοτικές ανθρακυκλίνες και τα γλυκοπεπτιδία της μπλεομυκίνης είναι πολύ σημαντικά αντικαρκινικά φάρμακα και χρησιμοποιούνται ευρέως στην χημειοθεραπεία του καρκίνου. Ενδεχομένως η καρδιοτοξικότητα των ανθρακυκλινών μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω αναστολέων ελευθέρων ριζών, δηλαδή αντιοξειδωτικές ουσίες ή παγιδευτές της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής, ωστόσο αυτή η αντιμετώπιση εγείρει ερωτηματικά του κατά πόσον η συγχορήγηση των αντιδότην επιφέρει αναστολή και των κυτταροτοξικών δράσεων των εν λόγω φαρμάκων. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η δράση των αντιοξειδωτικών είναι και από μόνη της αντικαρκινική, τουλάχιστον σε υψηλές δόσεις και οι σχετικές κλινικές έρευνες φαίνεται να το αποδεικνύουν.

Τα ανθρακυκλινικά αντιβιοτικά, όπως επίσης τα αλκαλοειδή της *Vinca rosea* και τα τερπενοειδή μόρια της *Taxus brevifolia* έχουν δείξει ότι υπάρχουν πάρα πολλές ουσίες προερχόμενες από την Φύση οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρύτατα για την αντιμετώπιση του καρκίνου με πολύ σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα (323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333).

Ε. Μικτοί αντικαρκινικοί παράγοντες

Εκτός από τις ήδη αναφερθείσες ουσίες, η αντικαρκινική έρευνα έχει δείξει ότι πολλές άλλες ουσίες, προερχόμενες από την χημική σύνθεση, είναι σε θέση να λειτουργήσουν αποτελεσματικά εναντίον των καρκινικών κυττάρων και της νεοπλασματικής νόσου τόσο στα ζώα, όσο και στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές και οι δράσεις τους έχουν περιληπτικώς ως ακολούθως:

1^ο) Η υδροξουρία

Η υδροξουρία αντιπροσωπεύει ένα απλό υδροξυλιωμένο παράγωγο της ουρίας, το οποίο, χορηγούμενο από στόματος, απορροφάται ταχέως από τον γαστρεντερικό σωλήνα και δρα άμεσα στην φάση S του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή κατά την διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Φαίνεται ότι το κύριο βήμα του συνολικού μηχανισμού δράσης της έγκειται στην αναστολή της αναγωγής των ριβοζονουκλεοτιδίων. Είναι πολύ αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, στα στάδια της βλαστικής κρίσης, όπως επίσης και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, καθώς επιφέρει ταχεία ελάττωση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Ακόμη και μια μόνο δόση του φαρμάκου είναι δυνατόν, εντός 24 ωρών, να μειώσει σημαντικά τον αριθμό των μυελοβλαστών, ενώ η μεγαλύτερη μείωση του αριθμού τους και συνεπώς η επίτευξη των χαμηλότερων τιμών αυτών, επιτυγχάνεται μέσα σε διάστημα τριών εικοσιτετραώρων. Μπορεί να αντικαταστήσει αποτελεσματικά την βουσουλφάνη στην αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Η ουσιαστικότερη παρενέργεια της υδροξουρίας συνίσταται στην καταστολή του μυελού των οστών.

2^{ον}) Η προκαρβαζίνη

Η προκαρβαζίνη είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας, ο οποίος, χημικά, αντιπροσωπεύει ένα παράγωγο της μεθυλο – υδραζίνης. Λειτουργεί, κατ' αρχάς, ως αναστολέας του ενζύμου μονοαμινοξειδάση (MAO), αλλά δεν είναι βέβαιο το κατά πόσον αυτή η αναστολή συνδέεται με τις αντικαρκινικές της δράσεις. Ο μηχανισμός δια του οποίου ενεργεί δεν είναι διευκρινισμένος. Γενικά, πιστεύεται, ότι, εφόσον η ουσία αυτή μπορεί να αυτοοξειδωθεί, είναι σε θέση να παράγει σημαντικές ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο δημιουργεί μέσω μηχανισμών ελευθέρων ριζών σημαντικές βλάβες στο DNA. Χρησιμοποιούμενη σε διάφορα πειραματικά μοντέλα, η προκαρβαζίνη, προκαλεί μείωση της μιτωτικής δραστηριότητας και διάσπαση της χρωματίνης, δηλαδή του χρωματοσωματικού υλικού. Δεν εμφανίζει διασταυρούμενη αντίσταση με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες, τουλάχιστον σε πειράματα επί ζώων και είναι ιδιαίτερα δραστική στην θεραπεία ασθενών με λέμφωμα Hodgkin, ειδικά εκεί που υπάρχει ανθεκτικότητα σε άλλα θεραπευτικά σχήματα. Εκτός από την νόσο του Hodgkin εμφανίζει κάποια δραστικότητα σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (κύτταρα βρώμης).

3^{ον}) Οι νιτροζουρίες

Οι νιτροζουρίες είναι υποκαταστημένα παράγωγα της ουρίας και αντιπροσωπεύουν ιδιαίτερα αποτελεσματικά φάρμακα στην αντιμετώπιση διαφόρων νεοπλασμάτων των ζώων και του ανθρώπου. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τρεις ενώσεις οι οποίες δοκιμάστηκαν στον άνθρωπο και έδειξαν αξιόλογη αποτελεσματικότητα. Οι ενώσεις αυτές είναι:

1^{ον}) Η 1, (2-χλωροαιθύλ)- 3- κυκλοεξύλ- 1-νιτροζουρία (CCNU),

2^{ον}) Η 1,(2-χλωροαιθύλ)-3-4-μεθύλκυκλοεξύλ-1-νιτροζουρία (MeCCNU)

και

3^{ον}) Η 1,3-δισ (2-χλωροαιθύλ) -1-νιτροζουρία (BCNU).

Η MeCCNU είναι αποτελεσματική στην θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, όπως επίσης και σε άλλους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος. Η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της MeCCNU και της 5-φθοριουρακίλης, σε καρκίνο του παχέος εντέρου, έδειξε διπλάσια

αποτελεσματικότητα, σε σύγκριση με την θεραπευτική δράση της μονοθεραπείας με 5-φθοριοουρακίλη.

Η CCNU και η BCNU εμφανίζουν καλή δραστηριότητα στην προχωρημένη νόσο του Hodgkin, που δεν ανταποκρίνεται σε άλλους παράγοντες, όπως επίσης και στην θεραπευτική των όγκων του εγκεφάλου, εξ αιτίας της αυξημένης τους λιποδιαλυτότητας, η οποία τους επιτρέπει να διέρχονται του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Η στρεπτοζοτοκίνη είναι μια νιτροζουρία φυσικής προέλευσης, η οποία χρησιμοποιείται, πειραματικά, για την πρόκληση διαβήτη σε πειραματόζωα. Το σάκχαρο που είναι συνδεδεμένο με την 1-μεθύλ-1-νιτροζουρία φαίνεται ότι διευκολύνει την μεταφορά της ουσίας μέσω της μεμβράνης των β-κυττάρων των νησιδίων του Langerhans. Η ιδιότητά της αυτή αποτελεί και την βάση της επιτυχούς χρησιμοποίησής της για την θεραπεία των καρκινωμάτων των νησιδίων του παγκρέατος.

Οι νιτροζουρίες εξ αιτίας της αυξημένης λιποδιαλυτότητάς τους χορηγούνται από το στόμα ή και παρεντερικά. Η BCNU χορηγείται κυρίως από το στόμα, ενώ η CCNU χορηγείται μεν από το στόμα, αλλά και παρεντερικώς, ως γαλάκτωμα. Τέλος η MeCCNU, η οποία παρουσιάζει και την μεγαλύτερη λιποδιαλυτότητα από τις εν λόγω τρεις ενώσεις, χορηγείται αποκλειστικά από το στόμα. Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης των νιτροζουριών δεν είναι σαφής. Οι ουσίες αυτές είναι δυνατόν να προκαλέσουν καθυστερημένα μυελοτοξικότητα, φαινόμενο το οποίο δεν είναι συνηθισμένο. Η μυελοτοξική τους δράση εμφανίζεται με μια καθυστέρηση 3 έως 4 εβδομάδων μετά την χορήγηση της ουσίας. Από τις χρησιμοποιούμενες θεραπευτικά νιτροζουρίες, η στρεπτοζοτοκίνη, είναι η μόνη που παρουσιάζει ελάχιστη ή ακόμη και μηδενική τοξικότητα για τον μυελό των οστών.

4^ο) Η ιμιδαζολ – καρβοξαμίδη

Η ιμιδαζολ-καρβοξαμίδη (ή διμεθυλ τριαζενο ιμιδαζολ–καρβοξαμίδη, συντομογραφία DTIC είναι ένα ανάλογο της 5-αμινοϊμιδαζολ-4-καρβοξαμίδης, η οποία είναι μια σημαντική πρόδρομη ουσία για την σύνθεση των πουρινών. Δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της δράσης της αν και υπάρχει η άποψη ότι λειτουργεί ως αντιμεταβολίτης. Η χρησιμοποίησή του ενδείκνυται

σε ασθενείς με σαρκώματα των μαλακών μορίων καθώς και μεταστατικό κακόηθες μελάνωμα.

5^{ον}) Το ένζυμο Ασπαραγινάση

Το ένζυμο ασπαραγίνη καταλύει την μετατροπή του αμινοξέος L-ασπαραγίνη σε L-ασπαρτικό οξύ. Έχει δειχθεί, κυρίως σε κυτταροκαλλιέργειες, ότι αρκετοί τύποι καρκινικών κυττάρων δεν δύνανται να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν όταν λείπει από το καλλιεργητικό μέσον τους η L-ασπαραγίνη, η οποία αποτελεί απαραίτητο αμινοξύ για αυτά. Η ανάγκη των εν λόγω ειδών των καρκινικών κυττάρων για πρόσθετη εξωγενώς L-ασπαραγίνη προκύπτει από την αδυναμία αυτών να συνθέσουν το συγκεκριμένο αμινοξύ, εξ αιτίας της έλλειψης της συνθετάσης της L-ασπαραγίνης, η οποία απαντά στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού. Η χρήση της ασπαραγινάσης αποδείχτηκε εξαιρετικά αποτελεσματική σε λευχαιμίες τόσο κλινικές όσο και πειραματικές, όπως επίσης και σε λεμφώματα. Ωστόσο η χορήγησή της συνοδεύεται και από ποικίλα τοξικά φαινόμενα καθόσον η δράση της φαίνεται ότι παρακωλύει την πρωτεϊνική σύνθεση και στους υγιείς ιστούς.

ΣΤ. Ορμονοθεραπεία του καρκίνου.

Γενικώς οι κακοήθεις όγκοι οι προερχόμενοι από όργανα των οποίων η λειτουργία είναι εξαρτημένη από ορμόνες, επηρεάζονται από τις δράσεις των ορμονών αυτών εμφανίζοντας διέγερση του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού. Η ιδιότητά τους να εξαρτώνται από την ορμονική δράση αποτελεί και έναν σημαντικό μηχανισμό θεραπευτικής παρέμβασης.

Γενικά, η ενδοκρινική προσέγγιση στην θεραπεία των ορμονοεξαρτώμενων νεοπλασμάτων περιλαμβάνει τις εξής ενέργειες:

- 1^{ον})** Την αφαίρεση των οργάνων που παράγουν ορμόνες.
- 2^{ον})** Την χορήγηση ορμονών και αντιορμονών.
- 3^{ον})** Την χορήγηση αναστολέων των ορμονικών υποδοχέων και γενικότερα των οδών δράσης των ορμονών στα κύτταρα.

Οι κυριότερες νόσοι στις οποίες υπάρχει υψηλή ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία αντιπροσωπεύονται από τα νεοπλάσματα του μαστού, της μήτρας, του προστάτη αδένου και του θυρεοειδούς αδένου. Από την άλλη πλευρά τα κορτικοστεροειδή του φλοιού των επινεφριδίων, καθώς και τα συνθετικά τους ανάλογα κατέχουν μια ιδιαίτερως εξέχουσα θέση στην ορμονοθεραπεία πολλών νεοπλασμάτων, όπως π.χ. οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα, οι όγκοι του Κ.Ν.Σ κ.α.

Το 65% των γυναικών με καρκίνο του μαστού, τα κύτταρα του οποίου παρουσιάζουν ορμονικούς υποδοχείς που δεσμεύουν τα οιστρογόνα, ανταποκρίνονται στην χορήγηση της κατάλληλης ορμονοθεραπείας, όπως επίσης και στους αναστολείς των εν λόγω ορμονικών υποδοχέων. Ακόμη, ένα 5% ανταποκρίνεται θετικά και στις περιπτώσεις στις οποίες δεν ανιχνεύονται υποδοχείς οιστρογόνων, είτε με στερητική προσέγγιση, είτε με προσθετική.

Η ύπαρξη υποδοχέων προγεστερόνης σε ασθενείς οι οποίοι διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων, συσχετίζεται με μεγαλύτερη θετική ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία. Σήμερα επικρατεί η άποψη ότι η ύπαρξη υποδοχέων δέσμευσης καταλλήλων ορμονών αποτελεί προϋπόθεση για την ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία. Γενικά οι κατευθύνσεις που ακολουθούνται έχουν ως εξής:

1^ο) Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε καρκινώματα του μαστού και του προστάτη. Θετική ανταπόκριση έχει καταγραφεί σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού (ποσοστό ανταπόκρισης 35%), χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν η παρουσία ορμονικών υποδοχέων των οιστρογόνων. Η αποτελεσματικότητα αυτής της προσέγγισης φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.

Η χορήγηση οιστρογόνων έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με αξιόλογη αποτελεσματικότητα σε άνδρες, κατόπιν υποτροπής καρκινώματος του προστάτη μετά γοναδεκτομή ή αντί αυτής. Ωστόσο δεν φαίνεται να παρέχουν επιπρόσθετο θεραπευτικό όφελος όταν χορηγούνται ταυτόχρονα με την γοναδεκτομή. Η χρησιμοποίηση διαφόρων τύπων οιστρογόνων είχε επιτυχία.

Παρά το γεγονός των θετικών τους δράσεων στην ορμονοθεραπεία του καρκίνου, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ο κίνδυνος της αύξησης της θνητότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα.

2^{ον}) Ανδρογόνα

Τα ανδρογόνα έχουν χορηγηθεί με καλά αποτελέσματα σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού (ποσοστό επιτυχίας 20%) Η θεραπεία αυτή είναι περισσότερο επιτυχής σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και ιδιαίτερα όταν υπάρχουν μεταστάσεις στα οστά. Υπάρχει μια ισότιμη δράση σε όλα τα χρησιμοποιηθέντα ενεργά ανδρογόνα. Τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χορήγησης των ανδρογόνων ορμονών απαιτούν την μεσολάβηση κάποιου χρόνου από την έναρξη της θεραπείας (συνήθως λίγες εβδομάδες). Το 90 % των περιπτώσεων που εμφανίζουν θετική ανταπόκριση τα αποτελέσματα φαίνονται μέσα στις οχτώ πρώτες εβδομάδες της θεραπείας. Σε διάφορες συγκριτικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα ανδρογόνα δεν είναι τόσο αποτελεσματικά όσο τα οιστρογόνα, εκτός των περιπτώσεων των γυναικών μετά την εμμηνόπαυση και σε περιπτώσεις ασθενών με μεταστάσεις στα οστά.

3^{ον}) Γεσταγόνα

Τα γεσταγόνα είναι ορμόνες που σχετίζονται με την προγεστερόνη, την παραγόμενη από το ωχρό σωματίο και τον πλακούντα. Οι θεραπευτικές τους δράσεις εκδηλώνονται στο 30% των γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του ενδομητρίου. Οι θετικότερες θεραπευτικές δράσεις εμφανίζονται σε ηλικιωμένες γυναίκες με καλά διαφοροποιημένους όγκους, στις οποίες ο χρόνος μεσολάβησης από την πρωτογενή εμφάνιση του όγκου μέχρι την υποτροπή αυτού είναι μεγάλος. Η υποχώρηση της νόσου μπορεί να διαρκέσει επί πολλά χρόνια. Θετικές θεραπευτικές δράσεις εμφανίζονται ακόμη σε μεταστατικό καρκίνο του νεφρού, σε ένα ποσοστό ίσο με το 20% των περιπτώσεων.

4^{ον}) Κορτικοστεροειδή των επινεφριδίων.

Τα κορτικοστεροειδή των επινεφριδίων είναι σημαντικά φάρμακα για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Ο μηχανισμός της δράσης τους δεν είναι

απολύτως αποσαφηνισμένος, αλλά φαίνεται ότι η διαδικασία της φλεγμονής παίζει σημαντικό ρόλο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, καθόσον και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ασκούν σημαντική αντικαρκινική δράση οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα συχνά στον θάνατο. Το πλέον χρησιμοποιούμενο φάρμακο με κορτικοστεροειδείς ιδιότητες είναι η πρεδνιζόνη, η οποία προκαλεί πλήρη αποδρομή στο 60% περίπου των περιστατικών με λεμφοβλαστική λευχαιμία. Σε ασθενείς πάσχοντες από χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία ένα 70% παρουσιάζει μερική υποχώρηση της νόσου. Οι σημαντικές θεραπευτικές δράσεις της πρεδνιζόνης στην οξεία λευχαιμία σχετίζονται πιθανόν με την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων κορτικοστεροειδών στα λευχαιμικά κύτταρα. Οι δράσεις των κορτικοστεροειδών είναι επίσης αξιόλογες στο πολλαπλούν μυέλωμα, καθώς και στα λεμφώματα. Ακόμη ασκεί ευεργετική δράση στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού, σε ποσοστό ανερχόμενο περίπου στο 10% των σχετικών περιπτώσεων. Η θετική δράση στον καρκίνο του μαστού ενδεχομένως οφείλεται στην καταστολή της παραγωγής οιστρογόνων από τον επινεφριδιακό φλοιό. Τα κορτικοστεροειδή των επινεφριδίων προκαλούν αναστολή των μιτώσεων και συνακόλουθα λύση των καρκινικών αλλά και των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων.

Γενικά ο συνολικός τομέας των αντιφλεγμονωδών φαρμάκων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

5^ο) Θυροξίνη

Η χορήγηση θυροξίνης μπορεί να αποβεί ευεργετική για την αντιμετώπιση μερικών θηλοειδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Τα καρκινώματα αυτά εξαρτώνται από την δράση της Θυρεοτρόπου ορμόνης (TSH) η οποία λειτουργεί επί αυτών ως αυξητικός παράγοντας. Η δράση της θυροξίνης μπορεί να ερμηνευτεί από την καταστολή της παραγωγής της TSH από την υπόφυση, την οποία προκαλεί μέσω του γνωστού μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης που διέπει τον θυρεοειδή αδένα με την αδενούπόφυση.

Τα δεδομένα αυτής της ενότητας, λήφθηκαν από τις ακόλουθες βιβλιογραφικές παραπομπές: 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343.

Z. Ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών συμμετέχει ενεργά στην προσπάθεια του οργανισμού να αντιμετωπίσει την νεοπλασματική νόσο. Όπως είπαμε και ανωτέρω, φαίνεται ότι πολλές μορφές καρκίνου, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ζώα, αναπτύσσονται και λαμβάνουν τον χαρακτήρα τόσο τοπικής όσο και συστημικής νόσου, εξ αιτίας αστοχιών στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι πρώτες σημαντικές παρατηρήσεις ότι η δυναμική της νεοπλασματικής νόσου συσχετίζεται στενά με τις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος καταγράφηκαν, ιστορικά, από τον William B. Cooley, το 1880 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο Cooley ήταν γενικός χειρουργός, ο οποίος παρατήρησε τυχαία, ότι σε μερικούς καρκινοπαθείς ασθενείς οι οποίοι προσβλήθηκαν από ερυσίπελας, σημειώθηκε σμίκρυνση ή και εξαφάνιση των όγκων. Ο Cooley πραγματοποίησε, μετά την αρχική παρατήρηση και το επόμενο τολμηρό βήμα: άρχισε να εγχύει ζωντανά βακτήρια μέσα σε όγκους μαλακών μορίων. Το αποτέλεσμα αυτής της παρέμβασης ήταν, σχεδόν πάντα, η ανάπτυξη μιας ισχυρής τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης, η οποία ακολουθούνταν από συρρίκνωση του κακοήθους όγκου. Ο Cooley θεωρητικοποίησε τις παρατηρήσεις του θεωρώντας ότι η χρήση ορών αποτελούμενων από βακτήρια θα μπορούσε να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών και έτσι να επιτευχθεί η επιτυχής αντιμετώπιση της κακοήθους νόσου.

Σήμερα ευρίσκονται τόσο υπό κλινικό πειραματισμό, όσο και υπό εφαρμογή αρκετά είδη παθητικής και ενεργού ανοσοποίησης σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, ενώ η σχετική έρευνα συνεχίζεται με εντατικό ρυθμό σε διάφορα μοντέλα νεοπλασματικής νόσου σε πειραματόζωα.

Στην παθητική ανοσοθεραπεία χορηγείται άνοσος ορός από συγγενείς, αλλογενείς ή ξενογενείς ξενιστές, στους ξενιστές που φέρουν το νεόπλασμα.

Ενεργητική ανοσοθεραπεία μη ειδικού τύπου επιχειρήθηκε με την χρήση βιολογικών παραγόντων, όπως ο βάκιλος Calmette-Guerin (BCG), το εκχυλιζόμενο με μεθανόλη υπόλειμμα του BCG (MER) και του *Corynebacterium parvum*. Οι παράγοντες αυτοί έχουν ως συνέπειά τους την ενίσχυση της χημικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας.

Από τις πρώτες μελέτες του BCG και του MER εξήχθη το συμπέρασμα ότι οι ουσίες αυτές εμφανίζουν κάποιο θεραπευτικό αποτέλεσμα, όσον αφορά την καθυστέρηση των υποτροπών ή την παρακώλυση της ανάπτυξης σε περιπτώσεις κακοήθους μελανώματος σταδίου II μετά από χειρουργική επέμβαση. Επίσης παρατηρήθηκε παράταση της αποδρομής στην οξεία μυελοκυτταρική λευχαιμία.

Η ειδική ενεργητική ανοσοθεραπεία συνίσταται στην ανοσοποίηση του ξενιστή με νεοπλασματικά κύτταρα, κυτταρικά εκχυλίσματα ή και κυτταρικά αντιγόνα χαρακτηριστικά των κακοηθών κυττάρων (Tumor Associated Antigens ή TAAs). Τα τελευταία αυτά είναι ειδικά αντιγόνα (πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, ένζυμα, σάκχαρα), τα οποία απαντώνται συχνά στα καρκινικά κύτταρα και είναι σχετικά μειωμένα ή απόντα στα φυσιολογικά του οργανισμού. Μέσα σε αυτά περιλαμβάνεται το Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο (CEA), το οποίο παράγεται από τους καρκίνους του παχέος εντέρου και άλλα αδenoκαρκινώματα, όπως αυτά του μαστού, του στομάχου, του πνεύμονα και του παγκρέατος, το ειδικό αντιγόνο του προστάτη (PSA) και η άλφα – εμβρυϊκή πρωτεΐνη (AFP), η οποία παράγεται από καρκίνους του ήπατος. Τα αντιγόνα αυτά υφίστανται ειδική επεξεργασία και ενίονται στους ασθενείς προκειμένου να αποτελέσουν ενεργούς στόχους του ανοσοποιητικού συστήματος τους και κατ' επέκταση, εναντίον των καρκινικών ιστών οι οποίοι τα περιέχουν.

Ήδη πραγματοποιούνται διάφορες κλινικές μελέτες με ασθενείς οι οποίοι έχουν εμβολιαστεί με ειδικές αντιγονικές πρωτεΐνες των όγκων, προκειμένου να επιτευχθεί ανοσοποίηση. Στις μελέτες αυτές δοκιμάζονται εμβόλια που αφορούν ανοσοποίηση εναντίον των ακολούθων καρκίνων: μαστού, όγκων που εκκρίνουν CEA, παχέος εντέρου, προστάτη, λεμφώματα, πνεύμονα, μελάνωμα, όγκων εγκεφάλου, όγκων τραχήλου της μήτρας.

Θα έπρεπε στο σημείο αυτό να μνημονεύσουμε τον αντικαρκινικό ορό Resan, ο οποίος άρχισε να χρησιμοποιείται ήδη από το 1992, ως προφυλακτικό μέτρο σε ομάδες ατόμων με υψηλό κίνδυνο νόσησης από καρκίνο και ο οποίος έδειξε αξιολογες θεραπευτικές δράσεις. Πολλά από τα δεδομένα των δράσεων του εν λόγω εμβολίου έχουν εξαχθεί στο νοσοκομειακό ίδρυμα Providence Pacific Hospital του Μεξικού. Σύμφωνα με τα δελτία επιστημονικής ενημέρωσης του εν λόγω ιδρύματος το εμβόλιο

Resan έχει δείξει τόσο θεραπευτικές όσο και προφυλακτικές δράσεις. Η θεραπευτική δραστηριότητα του εμβολίου εξαρτάται από: 1^ο) Το μέγεθος του όγκου και το μιτωτικό του δυναμικό. 2^ο) Από τον ιστολογικό τύπο του όγκου, την αντιγονική του δομή και τον αριθμό των μορίων του Μέγιστου Σύμπλοκου Ιστοσυμβατότητας (HLA) τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Το εμβόλιο αυτό ενδείκνυται και ως αντιμεταστατικός παράγοντας. Όταν η νόσος ευρίσκεται στο στάδιο III, ή στο στάδιο IV, τότε το εμβόλιο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χειρουργική θεραπεία, χορήγηση ιντελευκίνης-2 και γ-ιντερφερόνης. Το Resan δεν είναι τοξικό έναντι των φυσιολογικών κυττάρων, δεν είναι μεταλλαξιογόνο ή τερατογόνο και δεν περιέχει κύτταρα ή καρκινικό ιστό. Τα κύρια συστατικά του εμβολίου αντιπροσωπεύονται από γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες μιμούνται ειδικά τμήματα των καρκινικών αντιγόνων. Οι απόλυτες αντενδείξεις του εμβολίου είναι ελάχιστες, αλλά ο εμβολιασμός δεν ενδείκνυται κατά την εγκυμοσύνη, όπως επίσης και επί 3-4 εβδομάδες μετά μια λοίμωξη.

Είναι επίσης σημαντικό να αναφέρουμε, μια ενδιαφέρουσα βιοτεχνολογία παρασκευής εμβολίων κατά του καρκίνου, βασιζόμενη στις ιδιότητες των δενδριτικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δενδριτικά κύτταρα - των οποίων το όνομα περιγράφει και την μορφολογία τους που παρουσιάζει κυτταροπλασματικές προεκβολές εν είδη κλάδων δένδρου- είναι λευκοκύτταρα, τα οποία ορίζονται ως επαγγελματικά φαγοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα. Τα κύτταρα αυτά φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς ή καρκινικά κύτταρα, των οποίων σώματα διαμελίζονται στα διάφορα μακρομοριακά συστατικά που τα απαρτίζουν.

Στο εσωτερικό των δενδριτικών κυττάρων τα αντιγόνα, που χαρακτηρίζουν τους φαγοκυτταρωθέντες οργανισμούς, υφίστανται επεξεργασία και εν συνεχεία μεταφέρονται στις δενδριτικές προεκβολές και προβάλλονται προς το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η διαδικασία της προβολής των μακρομοριακών αντιγόνων των μικροοργανισμών, ή των καρκινικών κυττάρων, λαμβάνει χώρα στους λεμφαδένες και στον σπλήνα, με σκοπό την πληροφόρηση των T – λεμφοκυττάρων περί των μοριακών χαρακτηριστικών των αντιγόνων των μικροοργανισμών ή καρκινικών κυττάρων και την δημιουργία ανοσολογικής μνήμης με σκοπό την αντιμετώπιση και καταστροφή τους. Στην προπαρασκευή των εμβολίων με δενδριτικά κύτταρα,

έχει προηγηθεί έκθεση των αντιγόνων του όγκου σε αυτά, ώστε τα καρκινικά αντιγόνα να έχουν ενσωματωθεί και μεταφερθεί στις δενδριτικές αποφυάδες, προκειμένου να παρουσιαστούν στα Τ-λεμφοκύτταρα. Είναι φανερό, πως με την εν λόγω βιοτεχνολογία μπορούν να παρασκευασθούν οροί με δενδριτικά κύτταρα του ίδιου ασθενούς και με καρκινικά αντιγόνα προερχόμενα από τον δικό του κακοήγη όγκο, οπότε η εξειδίκευση του εμβολίου δύναται να αποκτήσει πλήρως εξατομικευμένο χαρακτήρα.

Διάφορες πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε καρκινοπαθή πειραματόζωα, με εγχύσεις δενδριτικών κυττάρων στα οποία έχουν ενσωματωθεί αντιγόνα του όγκου, έδειξαν ποσοστά θεραπείας στο 40 % των πειραματόζωων με όγκους κύστης τύπου MBT-2. Επίσης η ανοσοποίηση με δενδριτικά κύτταρα υπήρξε ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ένα μοντέλο μετάστασης με κύτταρα μελανώματος B-16. Μια μελέτη, η οποία έλαβε χώρα σε καρκινοπαθή παιδιά τελικού σταδίου, με την χρησιμοποίηση ανοσοποίησης μέσω δενδριτικών κυττάρων, έδειξε επίσης, σημαντικά αποτελέσματα.

Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ, διέθεσε το 1998, μόνον στο Πανεπιστήμιο του Pittsburgh, ένα κονδύλιο 7,7 εκατομμυρίων δολαρίων για έρευνα πάνω στην ανοσοποίηση με δενδριτικά κύτταρα με στόχο την αντιμετώπιση του καρκίνου (344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΟΤΑΝΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΦΥΤΩΝ VISCUM ALBUM & ABIES ALBA ΚΑΙ ΓΝΩΣΤΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥΣ.

A. *Viscum album*. Λευκός Ιξός

I. Γενικά

Ο Ιξός και οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι γνωστές από τα αρχαία χρόνια. Στους Αρχαίους Έλληνες ήταν γνωστός με τα ονόματα Ιξός, Ιξία, Υφέαρ και Στελής όπως αναφέρει ο ιδρυτής της βιολογίας των φυτών Θεόφραστος ο Ερέσιος (371 – 286 π.Χ.).

Ο Θεόφραστος στο έργο του «Περί Φυτών Αιτιών», εξηγεί γιατί ο Ιξός φύεται μόνο πάνω σε δένδρα και πως γίνεται η μεταφορά του από δένδρο σε δένδρο. Σχετικά με το πρώτο, συμπεραίνει ότι είναι στη φύση του φυτού η αδυναμία να αναπτυχθεί στο έδαφος. Ως προς το δεύτερο, εξηγεί ότι τα πουλιά τρώνε τις μονόσπερμες ράγες του φυτού και μετά τα σπέρματα αποβάλλονται και «κολλούν», με τη βοήθεια της κολλώδους ουσίας και της τύχης σε κλαριά κοντινών ή μακρινών δένδρων, όπου και φυτρώνουν.

Ο Βιργίλιος αναφέρει: «Για να ανοίξει τις πόρτες του Κάτω Κόσμου, η Περσεφόνη χρησιμοποίησε το μαγικό κλαρί του Ιξού, που ξέρουμε και σαν *Gui*» (Βιργίλιος, Αιν. 6.205).

Ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός χρησιμοποιούσαν τον Ιξό για να διαλύσουν αποστήματα. Το συνιστούσαν κατά της επιληψίας οι Ιπποκράτης, Διοσκουρίδης, Γαληνός, Θεόφραστος, Πλίνιος, Παράκελσος κ.α. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε για την ίδια αρρώστια σε συνδυασμό με ρίζα βαλεριάνας (δεν θεραπεύει αλλά ελαττώνει τον αριθμό των κρίσεων).

Σύμφωνα με τη μαρτυρία του φυσικού Πλίνιου του Πρεσβυτέρου (23 – 79 μ.Χ.), «οι Δρυίδες θεωρούσαν πιο σημαντική από τον Ιξό μόνο τη βελανιδιά, το κατεξοχήν θείκό δένδρο. Έτσι που αν μία τούφα από Ιξό είχε αναπτυχθεί πάνω σε μία βελανιδιά, ήταν σημάδι ότι ερχόταν από τον ουρανό και πως το δένδρο είχε επιλεγεί από έναν θεό. Τα ιερά δάση τους ήταν

γεμάτα από αυτά τα φυτά και η χρήση του φυλλώματός τους ήταν υποχρεωτική σε όλες τις θυσίες».

Ο όρος Δρυΐδης χρησιμοποιείται αναφορικά για τους ιερούργους της αρχαίας Κελτικής θρησκείας. Οι Κέλτες Δρυΐδες λοιπόν ήσαν μεταξύ των ιερέων οι μόνοι που μπορούσαν να χρησιμοποιούν το *Viscum album*.

Οι Δρυΐδες σεβόντουσαν τον Ιξό σαν το ιερότερο των ιερών, ειδικά όταν εμφανιζόταν στη βελανιδιά, το πιο ιερό τους δένδρο. Ήταν το «Ιερό Κλαδί» τους, το κλειδί για τον Παράδεισο και τον Κάτω Κόσμο.

Στο ημερολόγιο δένδρων των Δρυΐδων η 23^η Δεκεμβρίου είναι αφιερωμένη στον Ιξό, την ημέρα που κόβεται από τη βελανιδιά με τελετή. Μετά από προσευχές ο Αρχιδρυΐδης ανέβαινε πάνω στο δένδρο και έκοβε τον Ιξό με ένα χρυσό δρεπάνι.

Οι Δρυΐδες πίστευαν ότι ο Ιξός παρείχε προστασία στους κατόχους του από κάθε είδους κακή επίδραση, ενώ το χρησιμοποιούσαν σαν παράγοντα, ο οποίος προστάτευε από την δράση των δηλητηρίων και έδινε σε όσους το χρησιμοποιούσαν μακροβιότητα και γονιμότητα. Ίσως η επιλογή του χρυσού ως μετάλλου για την κατασκευή του ιερού δρεπανιού δεν είχε μόνον μια σημασία εξιδανίκευσης για τον τονισμό της ιερής και ευγενικής φύσης του εν λόγω φυτού, αλλά εμπειρικά, ήδη από εκείνη την εποχή είχαν παρατηρήσει ότι τα χάλκινα ή τα σιδηρά δρεπάνια ενδεχομένως προκαλούσαν πτώση της δύναμης των εκχυλισμάτων.

Σήμερα αυτό μπορούμε να το κατανοήσουμε καθόσον γνωρίζουμε ότι τόσο ο σίδηρος όσο και ο χαλκός μπορούν να προκαλέσουν οξειδωση σε κάποια ευαίσθητα βιολογικά υλικά, ενώ τα αδρανή μέταλλα, όπως ο χρυσός, δεν είναι σε θέση να αλλοιώσουν τους εν λόγω ευαίσθητους φυτικούς ιστούς.

Συνεπώς τόσο τα παλαιά εμπειρικά όσο και τα σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα τεκμηριώνουν την παρατήρηση ότι ο Ιξός περιέχει κάποια συστατικά τα οποία είναι πολύ ασταθή και καταστρέφονται εύκολα από οξειδωτικές διαδικασίες, όπως π.χ οι αντιδράσεις τύπου Fenton, δια των οποίων παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, στις οποίες τα άτομα του δισθενούς σιδήρου ή του μονοσθενούς χαλκού παίζουν τον ρόλο καταλυτών παρουσία οξειδωτικών αλλά και αναγωγικών χημικών σωμάτων.

Η χρήση του Ιξού από την τοπική λαϊκή ιατρική παράδοση των λεγόμενων Βικογιατρών (που κυρίως διασώζεται προφορικά) προβλέπει είτε την κατανάλωση ωμών τμημάτων του φυτού, είτε την παρασκευή αφεψημάτων όπου το φυτό εκχυλίζεται από καυτό νερό αλλά δεν επιτρέπεται ο βρασμός του. Επίσης η λαϊκή ιατρική παράδοση υιοθετεί και την εκχύλιση του αλεσμένου νωπού φυτού μέσω αλκοολούχων ποτών, όπως π.χ τσίπουρου ή κρασιού, σε γυάλινα ή πήλινα επισμαλτωμένα και αεροστεγώς κλεισμένα δοχεία με πηλό ή βουλοκέρι (ισπανικός κηρός). Είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα φυτά κόβονται είτε με τα χέρια, είτε με ξυλομάχαιρα, ενώ ο θρυμματισμός τους γίνεται σε πέτρινα σκεύη και με γουδιά ξύλινα ή πέτρινα.

Η Χριστιανική παράδοση πιστεύει ότι ο Ιξός ήταν κάποτε δένδρο, από του οποίου το ξύλο φτιάχτηκε ο σταυρός που σταυρώθηκε ο Χριστός. Το δέντρο σ' αυτή τη περίπτωση μαραίνεται από μεγάλη ντροπή και μεταμορφώνεται σε ένα φυτό το οποίο παρέχει άφθονη καλή τύχη σε όλους όσους περνούν κάτω από αυτό.

Στις μέρες μας κρεμάνε κλαδιά Ιξού πάνω από τις πόρτες των σπιτιών, τις ημέρες των Χριστουγέννων.

Από την επιστημονική πλευρά αποτελεί ένα φυτικό είδος το οποίο περιγράφηκε και ταξινομήθηκε από τον ίδιο τον Λιναίο, όπως δείχνει και η προσθήκη του L στο συστηματικό του όνομα (*Viscum album* L.) (366, 367).

II. Βοτανική ταξινόμηση και περιγραφή του *Viscum album*.

Το φυτό *Viscum album* L είναι ένα θαμνοειδές και αιθαλές ημιπαράσιτο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Λωρανθιδών (*Loranthaceae*) (Τάξη *Sadalodales*) η οποία εμφανίζει ευρεία κατανομή σε όλη την Υδρόγειο (368).

Οι Λωρανθίδες είναι μικρά θαμνοειδή φυτά, τα οποία παρασιτούν επί των Γυμνοσπέρμων όπως επίσης και επί των ξυλωδών φυτών των Αγγειοσπέρμων. Τα φύλλα τους είναι αντίθετα ή ατρακτοειδή (σπονδυλωτά), ολόκληρα και ενίοτε κλιμακωτά. Τα άνθη τους είναι ακτινομορφικά και στα Ευρωπαϊκά είδη μονογενή και συνήθως τετραμερή. Περιάνθιο σε ένα ή δύο σπονδύλους, το εσωτερικό του περισσότερο ή λιγότερο πεταλοειδές, με τα

τμήματά του ελεύθερα ή ενωμένα. Οι στήμονες είναι επιπέταλοι, τοποθετημένοι απέναντι από τα πέταλα. Η ωοθήκη είναι υποφυής με ωάρια που συνήθως δεν διαφοροποιούνται από τον πλακούντα και ο ύπερος (στήλος) απλός ή 0. Ο καρπός είναι σαρκώδης, σπάνια ξηρός και διαρρηκτός. Το σπέρμα είναι μονήρες, χωρίς επισπέρμιο (δηλαδή εξωτερικό σκληρό κέλυφος) και ο αριθμός των εμβρύων κυμαίνεται από ένα έως τρία (368).

Η οικογένεια των λωρανοειδών περιλαμβάνει τα γένη *Loranthus* L., *Arceuthobium* Bieb. και *Viscum* L.

Το τρίτο γένος των λωρανοειδών που αποτελεί και εκείνο με το οποίο ασχολήθηκε πειραματικά η ανά χειράς διδακτορική διατριβή είναι το γένος *Viscum* L στο οποίο ανήκει το φυτό του οποίου ελέγξαμε τις βιολογικές του ιδιότητες.

Η γενική βοτανολογική περιγραφή του γένους των Ιξών έχει, εν συντομία ως εξής:

Το γένος αυτό περιλαμβάνει φυτά τα οποία έχουν:

1^{ον}) Φύλλα αντίθετα ή ατρακτοειδή (σπονδυλωτά - ελικοειδή), με 3 - 7 παράλληλα νεύρα, δερματώδη.

2^{ον}) Ταξιανθία κυματοειδή, με άνθη συνωστιζόμενα (συμπιεσμένα). Το περιάνθιο περιλαμβάνει 2 σπονδύλους.

3^{ον}) Ο Κάλυκας στα μεν θηλυκά άνθη είναι 4-οδόντων, ενώ στα αρσενικά άνθη είναι ανύπαρκτος. Τα πέταλα είναι συνήθως 4. Οι στήμονες είναι σχεδόν απολύτως ενωμένοι (σύμφυτοι) με τα πέταλα, οι ανθήρες ανοίγουν από τους πόρους.

4^{ον}) Ο καρπός είναι ένα λευκό, κίτρινο ή κόκκινο, κολλώδες (ιξώδες) μούρο.

Η ταξιανθία στο *Viscum cruciatum* έχει μίσχους κοντούς, ενώ ο καρπός είναι ερυθρός και σαρκώδης. Αντιθέτως στο *Viscum album* η ταξιανθία είναι άμισχη και ο καρπός είναι σαρκώδης, κίτρινος ή λευκός (368).

Κατωτέρω ακολουθεί μια συνοπτική περιγραφή των σημαντικότερων ειδών του γένους των Ιξών:

1. *Viscum cruciatum*.

Η πρώτη συστηματική του περιγραφή έγινε το 1840 συστηματικά από τους Sieber et Boiss.

Τα βασικά στοιχεία της περιγραφής του έχουν ως εξής: Θαμνώδες φυτό με κλάδους (μίσχους) μήκους έως 60 cm και χρώμα κιτρινωπό – πράσινο. Τα φύλλα του έχουν μήκος 2 – 4 cm, συχνά ατρακτοειδή (ελικοειδή), ωοειδή – στενόμακρα, στρογγυλεμένα (αμβλεία), χρώματος κιτρινωπού – πρασίνου. Η ταξιανθία είναι κυματώδης με μίσχους βραχείς. Ο καρπός είναι μικρός, 6 – 10 mm, χρώματος ερυθρού και υφής σαρκώδους.

Παρασιτεί κατά ποικίλων Δικοτυλήδων δένδρων και θάμνων. Απαντάται στην Νότια Ισπανία, σε μια περιοχή της ανατολικής Πορτογαλίας και στην Βόρειο Αφρική (368).

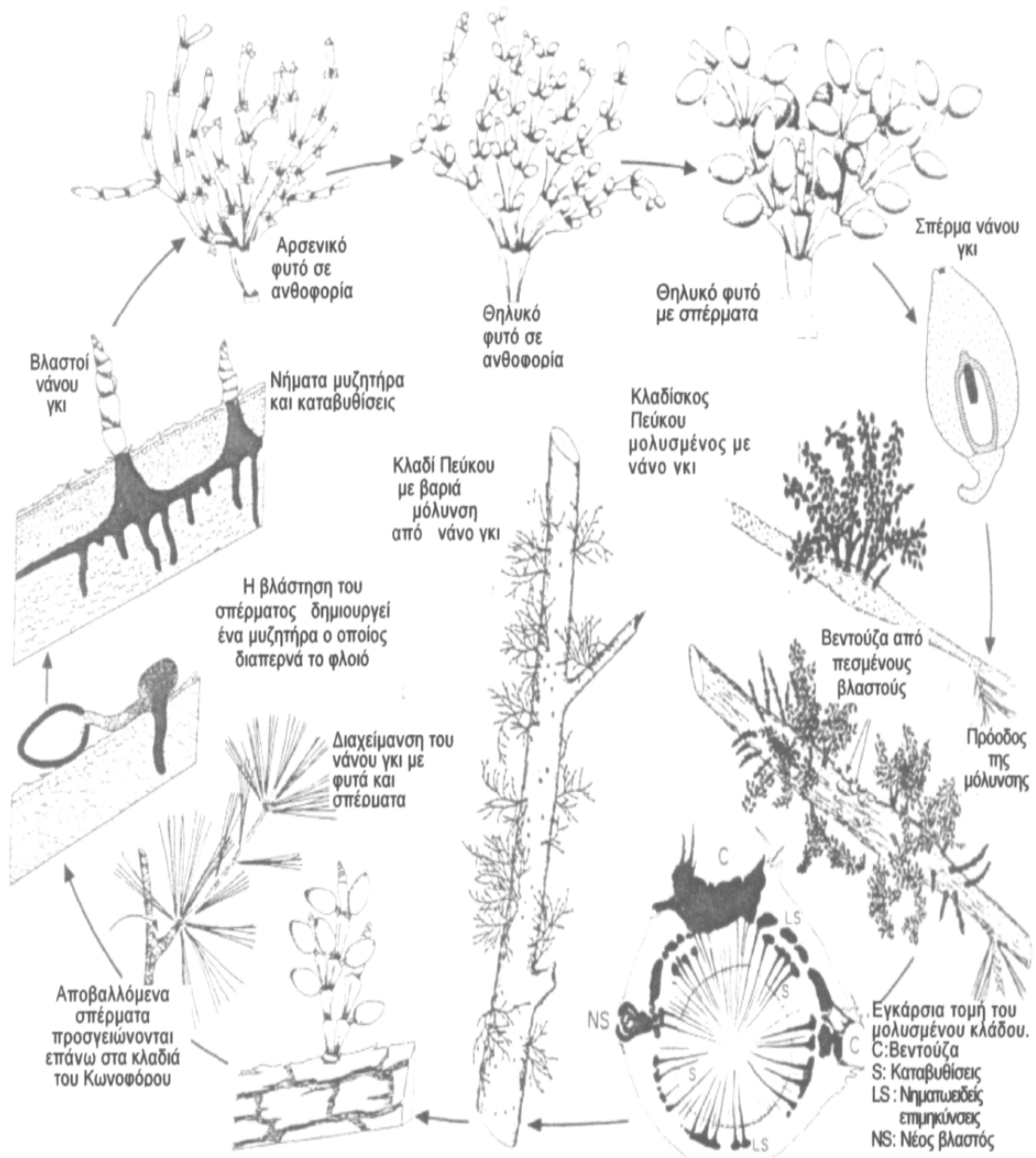
2. *Viscum album L.*

Η πρώτη συστηματική περιγραφή του εν λόγω φυτού έγινε το 1753 από τον Λιναίο [(Sp. PL 1023, 1753) (incl. *V. laxum* Boiss. & Reuter)].

Εικόνα 1.

Ωστόσο το φυτό ήταν ήδη γνωστό από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και για την τελετουργική – θρησκευτική χρήση. Είναι ένα θαμνοειδές επίφυτο με κλάδους που φθάνουν τα 100 cm και χρώματος κίτρινου – πρασίνου. Τα φύλλα έχουν μήκος 2 – 8 εκ, είναι αντίθετα, με σχήμα ωοειδές στενόμακρο, στρογγυλεμένα (αμβλεία), κιτρινωπά – πράσινα. Η ταξιανθία είναι κυματώδης και άμισχη. Ο καρπός μικρός (6-10 mm), σφαιροειδής ή απιοειδής, σαρκώδης και λευκόχρωος ή περιστασιακά κίτρινος. Ο αριθμός χρωματοσωμάτων του διπλοειδούς κυτταρικού πυρήνα $2n = 20$.

Παρασιτεί εναντίον διαφόρων δένδρων. Απαντάται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, προς τα βόρεια τμήματά της Νότιας Σουηδίας και προς ανατολάς του 41^{ου} μεσημβρινού, στην νότια Ρωσία. Η διάδοσή του στην υδρόγειο είναι πολύ μεγάλη και ελάχιστες είναι οι χώρες στις οποίες δεν έχει βρεθεί (368).



Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του βιολογικού κύκλου του *Viscum album*.

Όσον αφορά τα υποείδη που υπάρχουν, έχουμε τα εξής:

(α) *Viscum album* subsp. *album*:

Φύλλα μεταβλητά, μη αντιπροσωπευτικά του είδους. Καρπός σαρκώδης, συνήθως λευκός, σφαιρικός. Άκρες του σπέρματος ευθείες (ίσιες). Έμβρυα 2 ή 3.

Παρασιτεί κατά των δικοτυλήδων δένδρων. Βρίσκεται σε κάθε σημείο της ζώνης διαβίωσης των ειδών.

(β) *Viscum album subsp. abietis* (Wiesb.) Abromeit σε Wunsche, Pfl. Deutschl. 12,182 (1928) (*Viscum laxum* var. *abietis* (Wiesb.) Hayek).

Φύλλα μέχρι 8 εκ. Σαρκώδης καρπός, απιοειδής, συνήθως λευκού χρώματος. Σπέρμα με κυρτά άκρα. Αριθμός εμβρύων 1 ή 2.

Παρασιτεί στο *Abies* και ευρίσκεται στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη.

Πρόκειται για το συγκεκριμένο υποείδος, το οποίο αναφέρεται στην εν λόγω διδακτορική διατριβή (368).

(γ) *Viscum album subsp. austriacum* (Wiesb.) Vollmann, PL Bayern 212 (1914) (*Viscum laxum* Boiss. & Reuters var. *pini* (Wiesb.) Hayek):

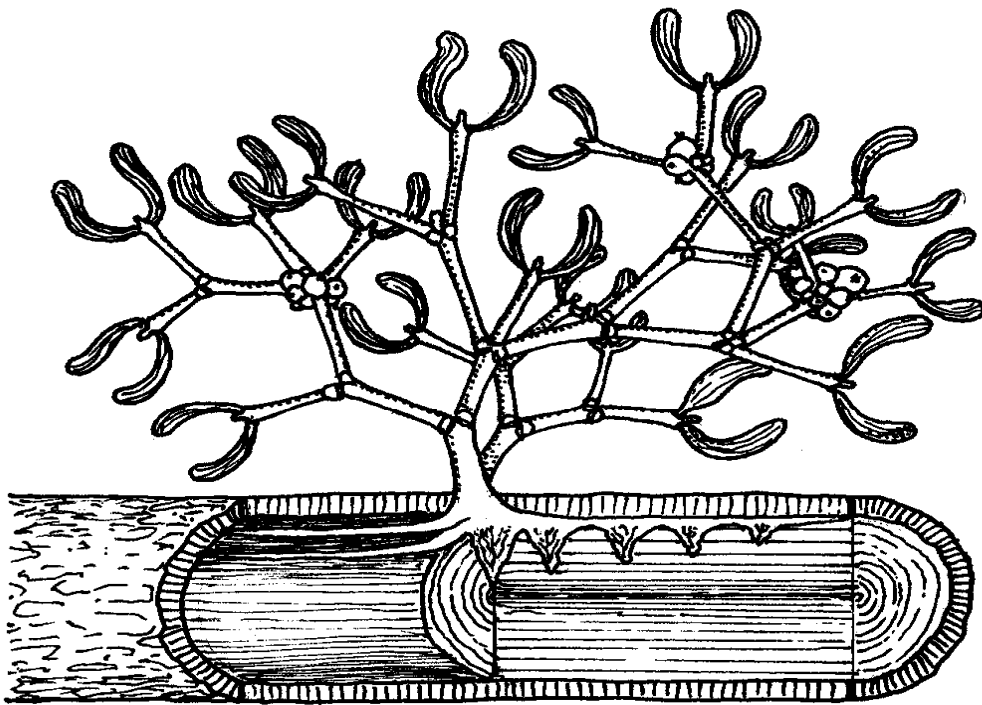
Όμοιο με το υποείδος Β, αλλά με φύλλα από 2 έως 6 εκ, μέχρι 6 περιόδους εφ όσον αναπτυχθούν πλήρως. Σαρκώδης καρπός, συνήθως κίτρινος.

Παρασιτεί κατά των πεύκων και των *Larix* spp. Βρίσκεται στην Κεντρική Ευρώπη και κατά τόπους στην Νότια Ευρώπη (368).

III. Βιολογία – Πολλαπλασιασμός - Συστατικά.

Ο Ιξός έχει ιδιόμορφη βιολογία. Κατά τη βλάστηση τα σπέρματα δίνουν βλαστίδιο, το οποίο έχει αρνητικό φωτοτροπισμό. Καθώς η κορυφή του κυρτώνεται προς τα κάτω, στην επιφάνεια της φλούδας του κλαδιού, πλατύνεται και προσκολλάται με δισκοειδές όργανο. Από το κέντρο αυτού του οργάνου μερικά κύτταρα τρυπούν τη φλούδα και σχηματίζονται μυζητήρες που φτάνουν έως το κάμβιο. Ακολούθως, μεταξύ φλοιού και ξύλου, αναπτύσσεται δίκτυο μυζητήρων, ιδιαίτερα στην κατά μήκος διεύθυνση των κλάδων. Η διείσδυση των μυζητήρων μέσα στον ξενιστή γίνεται με τη δράση ορισμένων ενζύμων.

Οι μυζητήρες είναι ρίζα παρασιτικών φυτών που εισχωρεί στον κορμό άλλων φυτών για να απορροφήσει νερό και θρεπτικές ουσίες. **Εικόνα 2.**



94/01
© BIODIDAC, Livingstone

Εικόνα 2. Τομή ξύλου ξενιστή – μυζητήρες ιξού.

Τα πουλιά σκορπίζουν γύρω τους κολλώδεις σπόρους του Ιξού όταν ακονίζουν τα ράμφη τους πάνω στα κλωναράκια του. Ένα τέτοιο είδος πουλιού είναι το *Sylvia atricapillae*. Οι καρποί του Ιξού που μοιάζουν με κερασάκια, τρώγονται από τα πουλιά και οι σπόροι τους μπορούν να γονιμοποιηθούν μόνο αφού περάσουν απ' το πεπτικό σύστημα των πουλιών και βγουν με τα περιττώματα αφού οι καρποί δεν αφομοιώνονται. Ο Ιξός αναπαράγεται μόνο με αυτό τον τρόπο, αφού έχει αποδειχτεί ότι οι σπόροι δεν βλαστάνουν όταν τοποθετηθούν σε νερό ή χώμα (369).

Συστατικά: Το γκι περιέχει διάφορα σημαντικά συστατικά, μερικά από τα οποία όπως τα αλκαλοειδή μπορούν να ποικίλουν ανάλογα με τα είδη των ξενιστών που αναπτύσσονται. Γενικά αποτελείται από μείγμα ενώσεων που περιλαμβάνουν φλαβονοειδή (κουερσιτίνη, χαλκόνη και παράγωγα φλαβονών), τερπενοειδή (π.χ. β-αμυρίνη μπετουλινικό οξύ, ολεανικό οξύ, β-σιποστερόλη, στιγμαστερόλη, ουρσολικό οξύ, συνδυασμός λουπεόλη και

εστέρα), αμίνες (π.χ. ακετυλοχολίνη, χολίνη, ισταμίνη, GABA και τυραμίνη), και οι βισκοτοξίνες A2, A3 και B. Το γκι περιέχει επίσης μια ποικιλία φαινολικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένου του καφεϊκού και μυριστικού οξέος, λεκτίνες, λιπαρά οξέα, σάκχαρα, τανίνες και κολλώδη ουσία (370).

IV. Φαρμακευτικές ιδιότητες και χρήσεις του *Viscum album* L

Πέρα από τις παραδοσιακές εφαρμογές στην λαϊκή θεραπευτική, το *Viscum album* άρχισε να τυγχάνει σοβαρής Ιατρικής μελέτης από το 1917 χρησιμοποιούμενο ως θεραπευτικό βοήθημα για την αντιμετώπιση του καρκίνου (371).

Η βάση αυτής της χρήσης στηρίχτηκε στην ανθρωποφιλοσοφική κίνηση του Rudolf Steiner, ο οποίος δήλωσε την εποχή εκείνη ότι το γκι θα αντικαθιστούσε τελικά τη χρήση του χειρουργικού νυστεριού για την θεραπευτική των όγκων. Το 1920 ο Rudolf Steiner ίδρυσε τον Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου για να προωθήσει τα εκχυλίσματα του γκι και την ανθρωποφιλοσοφική (ανθρωποσοφική) Ιατρική. Σήμερα, το γκι αντιπροσωπεύει ένα αρκετά χρησιμοποιούμενο ογκολογικό φάρμακο στη Γερμανία. Επίσης η μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της ιατρικής έρευνας για τις βιολογικές δράσεις του *Viscum album* έχει πραγματοποιηθεί από Γερμανούς ερευνητές.

Η μελέτη του *Viscum album* διέδραμε με δυσκολία μέσα στα χρόνια από το 1917 μέχρι τα τέλη του 1950. Οι αιτίες της καθυστέρησης αυτής είναι μάλλον πολλαπλές και πιθανότατα σχετίζονται με το γεγονός ότι οι δράσεις των εκχυλισμάτων του ακολουθούσαν έναν μηχανισμό ο οποίος δεν εισερχόταν στα όρια της επικρατούσας αντίληψης περί αντικαρκινικών θεραπειών που είχαν τεθεί τις πρώτες δεκαετίες του εικοστού αιώνα (χειρουργική αντιμετώπιση, κυτταροστατικά αντιβιοτικά, ακτινοθεραπεία). Η περίοδος του πολέμου αποτέλεσε ένα μεγάλο κώλυμα στην σχετική έρευνα και μετά το πέρας του μπορούμε να πούμε ότι έλαβαν χώρα οι πιο σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες τόσο στο βασικό όσο και στο κλινικό επίπεδο για την αποσαφήνιση των δράσεων των εκχυλισμάτων του *Viscum album*. Μέχρι το 1960 οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δεν ευρίσκονται στις μεγάλες βάσεις δεδομένων και μόνον

σποραδικά μπορεί κανείς να βρει πληροφορίες για την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων του Ιξού.

Οι πρώτες σαφείς κλινικές μελέτες που ασχολούνται με τις αντικαρκινικές δράσεις του *Viscum album* λαμβάνουν χώρα την αρχή της δεκαετίας του 1970.

Μια προγενέστερη μελέτη είχε δημοσιευτεί το 1967 και εστιαζόταν στην πρόληψη των υποτροπών καρκίνων του γενετικού συστήματος μετά την χρήση ακτινοθεραπείας με την χορήγηση του Iscador, ενός τιτλοποιημένου παρασκευάσματος του *Viscum album*. Στην μελέτη αυτή ο συγγραφέας διαπιστώνει θετική δράση του Iscador στην πρόληψη των υποτροπών του καρκίνου των γενετικών οργάνων (372).

Μια δεύτερη μελέτη δημοσιεύεται το 1973, από τον Gaubatz E, στην Γερμανική γλώσσα και συγκρίνει το προσδόκιμο επιβίωσης καρκινοπαθών ασθενών πασχόντων από βρογχογενείς καρκίνους του πνεύμονα, μετά από επιτυχή χειρουργική αφαίρεση του όγκου και μετεγχειρητική κυτταροστατική αγωγή (trenimon, cealysin) του *Viscum album* (373). Τα ευρήματα του συγγραφέα είναι θετικά για την χρήση του *Viscum album* καθώς καταγράφει μια αξιόλογη αύξηση της πενταετούς επιβίωσης των μετεγχειρητικών ασθενών με την χρήση των εκχυλισμάτων του Ιξού, εν συγκρίσει με τους ασθενείς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία.

Ένα άλλο άρθρο δημοσιεύεται, επίσης στην Γερμανική, το 1977, (374) που μελετούσε την μετεγχειρητική πενταετή και δεκαετή επιβίωση των ατόμων ενός δείγματος 547 γυναικών που έπασχαν από καρκίνο του μαστού σταδίου I και II και στις οποίες χορηγήθηκε το παρασκεύασμα Iscador του *Viscum album*. Ο συγγραφέας συγκρίνει την επιβίωση των γυναικών που έλαβαν το *Viscum album* με την επιβίωση γυναικών των ίδιων σταδίων που έλαβαν κλασσική χημειοθεραπεία και διαπιστώνει ότι υπάρχει σημαντική επέκταση του πενταετούς και δεκαετούς προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών στις οποίες δόθηκε το *Viscum album* εν συγκρίσει με εκείνες που έλαβαν την χημειοθεραπεία. Επίσης είναι πολύ σημαντική η διαπίστωση του συγγραφέα ότι η χορήγηση του παρασκευάσματος του *Viscum album* δεν συνοδεύεται από παρενέργειες.

Το 1979 οι Hassauer W., Gutsch J. και Burkhardt R. (375), δημοσιεύουν μια αναδρομική μελέτη επί όλων των περιστατικών γυναικών με καρκίνο ωοθηκών οι οποίες έλαβαν μετεγχειρητική αγωγή με το παρασκεύασμα Iscador του *Viscum album* στην Γυναικολογική Κλινική Gemeinnutziges

Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke, από τον Νοέμβριο του 1969 μέχρι το 1978 (*Onkologie* 1979 Feb. 2 (1): 28 – 36.). Οι συγγραφείς συνέκριναν το δείγμα των εν λόγω καρκινοπαθών γυναικών με ένα ισότιμο δείγμα καρκινοπαθών γυναικών που έπασχαν από την ίδια νόσο εμφανίζοντας παρόμοια σταδιοποίηση, αλλά που αντιμετώπιστηκαν με κλασσική αγωγή η οποία περιλάμβανε το φάρμακο Cytoval. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 50,9 ετών. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών που έλαβαν Iscador (*Viscum album*) ήταν 100% για τα στάδια I και II, 23% για το στάδιο III και 0% για το στάδιο IV. Οι συγγραφείς σημειώνουν επίσης ότι παρά το γεγονός των λιγότερο ευνοϊκών προγνωστικών δεικτών που ίσχυαν για τις ασθενείς της ομάδας του Iscador (*Viscum album*), ωστόσο αυτές εμφάνισαν μια μέση επιβίωση 16,2 μηνών σε σχέση με τις ασθενείς της ομάδας του Cytoval, οι οποίες επιβίωσαν κατά μέσον όρο 5,2 μήνες (λόγος 3: 1). Η περίοδος επιβίωσης των ασθενών III σταδίου που έλαβαν Iscador ήταν 4,2 φορές μεγαλύτερος, ενώ του σταδίου IV ήταν 1,6 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με την περίοδο επιβίωσης των αντίστοιχων ασθενών που ελάμβαναν Cytoval. Η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική ($P < 0,018$). Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο ομάδων δείχνει ότι το ειδικό παρασκεύασμα Iscador του Ιξού, αποτελεί ένα χρήσιμο και αποτελεσματικό θεραπευτικό μέσο του καρκίνου της ωοθήκης, ειδικά καθόσον συνήθως δεν προκαλεί βαριές και ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Σε ένα άρθρο ιστορικής ανασκόπησης που δημοσιεύτηκε από τους Bruseth S και Enge A (376) οι συγγραφείς επιβεβαιώνουν ότι τα εκχυλίσματα του Ιξού εισήλθαν στην θεραπευτική του καρκίνου το 1917 και ότι οι κλινικές μελέτες που έχουν γίνει μέχρι το 1993 επί των αντικαρκινικών δράσεων του *Viscum album* υπερβαίνουν τις 40. Οι μελέτες αυτές έχουν διεξαχθεί κυρίως στην κλινική Lukas στην Ελβετία, όπως επίσης και στο Ινστιτούτο Ludwig Boltzmann, στην Αυστρία. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι περισσότερες από τις εν λόγω μελέτες καταλήγουν στο ότι ο Ιξός έχει μια θετική δράση, αλλά είναι φτωχές ως προς τον μεθοδολογικό τους σχεδιασμό και υποδεικνύουν την πραγματοποίηση μιας τυχαιοποιημένης πολυκεντρικής μελέτης προκειμένου να εκτιμηθεί με την πρέπουσα ακρίβεια η αντικαρκινική δράση των παρασκευασμάτων του Ιξού.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συγγραφείς θέτουν υπεράνω αμφισβήτησης το γεγονός ότι ο Ιξός έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, αλλά θέτουν

επίσης ως σημαντικό στόχο ότι οι ιδιότητες αυτές είναι αναγκαίο να αποτιμηθούν σε όλη την έκτασή τους με την δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια και για πολλούς τύπους νεοπλασμάτων.

Την ίδια χρονιά (1993) δημοσιεύεται ένα άλλο άρθρο ανασκόπησης και μάλιστα ακριβώς τον ίδιο μήνα με θέμα τις λεκτίνες του *Viscum album* ως επαγωγείς των κυτταροκινών και ως ανοσοδιεγερτικού παράγοντα στην θεραπεία του καρκίνου με μοναδικό συγγραφέα τον Velio Bozzi (377), καθηγητή του Ινστιτούτου Γενικής Φυσιολογίας και Διατροφικής Επιστήμης του Πανεπιστημίου της Σιένας (Ιταλία).

Ο συγγραφέας του εν λόγω άρθρου επισημαίνει ότι η θεραπεία του καρκίνου μέσω εκχυλισμάτων Ιξού εφαρμόζεται στην Ευρώπη ήδη από έξι δεκαετίες κυριολεκτικά επί χιλιάδων ασθενών με πλεονεκτήματα τα οποία δεν έχουν απολύτως σταθμιστεί. Ο Bozzi σημειώνει ότι η εν λόγω θεραπευτική προσέγγιση αντιμετώπισε ουσιαστικά και μεγάλα προβλήματα καθόσον στάθηκε εξαιρετικά δύσκολος ο εντοπισμός και η απομόνωση των ενεργών συστατικών του φυτού. Ωστόσο μετά την απομόνωση της βισκουμίνης (Viscumín) και την περιγραφή της σε όρους λεκτινών δεν υπάρχουν πλέον επιχειρήματα για την μη ορθολογική χρήση αυτού του φυτού στην θεραπευτική του καρκίνου. Ο συγγραφέας θεωρεί ότι οι λεκτίνες αποτελούν ισχυρούς διαβιβαστές της φλεγμονής που είναι ικανοί να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε υψηλό βαθμό, ωστόσο στο κείμενό του υποστηρίζει ότι αυτές δεν είναι τα μοναδικά ενεργά συστατικά του *Viscum album*. Ο συγγραφέας καταλήγει ότι τα παρασκευάσματα με βάση τον Ιξό ανεπιφύλακτα μπορούν να βοηθήσουν την ανοσοθεραπεία του καρκίνου και ότι υπάρχει αναγκαιότητα όλα τα συμπεράσματα να αποδεικνύονται από τον πειραματισμό και να μην υπαγορεύονται από το συναίσθημα και την διαίσθηση. Συνεπώς, η αναγκαιότητα της περαιτέρω μελέτης είναι κρίσιμη και για την περαιτέρω αξιοποίηση και βελτίωση της αντικαρκινικής χρήσης του Ιξού.

Το θέμα, δηλαδή, παρέμεινε ακόμη ανοιχτό τόσο στο κλινικό όσο και στο βασικό ερευνητικό επίπεδο το 1993.

Από τα δεδομένα παραμένει ακόμη ανοιχτό, καθόσον η γενόμενη έρευνα στο ενδιάμεσο έδωσε ακόμη μεγαλύτερη έμφαση στο γεγονός ότι ναι μεν οι λεκτίνες του Ιξού δρουν ανοσοδιεγερτικά αλλά από την άλλη πλευρά

φαίνεται ότι υπάρχουν και άλλα συστατικά τα οποία συνεισφέρουν στο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Μια πειραματική μελέτη η οποία έλαβε χώρα το 2001 στο Ινστιτούτο Rudjer Boskovic του Ζάγκρεμπ της Κροατίας εκ μέρους του Zarkovic N. (378) και των συνεργατών του δείχνει ότι η ενέσιμη χορήγηση του παρασκευάσματος Isorel του φυτού *Viscum album* μπορεί να αποτελέσει ένα καλό βοήθημα στην θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη, πειραματικών καρκίνων σε ποντικούς. Η τοπική χορήγηση του Isorel έδειξε ότι υπήρχε πλήρης εξαφάνιση των όγκων στα 2/7 των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ από την άλλη πλευρά σημειώθηκε σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη των όγκων και αναστολή της ενσωμάτωσης αμινοξέων ραδιοσημανθέντων με Τρίτιο στα καρκινικά κύτταρα αυτών. Επίσης στα ζώα που έλαβαν Isorel σημειώθηκε μείωση των μεταστάσεων στο 1/3 των ζώων της ομάδας ελέγχου. Οι συγγραφείς σημειώνουν ότι η χορήγηση του παρασκευάσματος αύξησε την αντιδραστικότητα των λεμφοκυττάρων των καρκινοπαθών μυών στην δράση μιτογόνων ερεθισμάτων από κονκαναβαλίνη και λιποπολυσακχαρίτη *in vitro*, αποδεικνύοντας έτσι τις ανοσοδιεγερτικές δράσεις επί των κατεσταλμένων από τον καρκίνο λεμφοκυττάρων των πειραματόζωων. Τέλος οι συγγραφείς διαπιστώνουν ότι η δράση του σκευάσματος σχετίζεται επίσης και από την εγγύτητα του όγκου από το σημείο έγχυσής του, καθόσον οι όγκοι που απείχαν περισσότερο από το σημείο έγχυσης εμφάνισαν μικρότερη καταστροφή και επιβράδυνση ανάπτυξης. Οι συγγραφείς καταλήγουν στην διαπίστωση ότι δεν είναι μόνον οι λεκτίνες τα δραστικά συστατικά του Isorel αλλά επίσης και τα μόρια μικρού μοριακού βάρους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση.

Ο ίδιος συγγραφέας σε μια άλλη πειραματική εργασία που είχε πραγματοποιηθεί το 1997 (379, 380) καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το Isorel, ως υδατικό εκχύλισμα όλου του φυτού *Viscum album*, χορηγούμενο σε ποντικούς οι οποίοι είχαν καταστεί καρκινοπαθείς από μελάνωμα (cell line B16F10) αναστέλλει την ανάπτυξη των μελανωματικών όγκων, όπως επίσης μειώνει και το πλήθος των μεταστάσεων, επηρεάζοντας την ανοσολογική σχέση όγκου και ξενιστή αυτού. Στην μελέτη αυτή οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια υψηλή δόση (100 mg / kg βάρους σώματος) του παρασκευάσματος Isorel (υδατικό εκχύλισμα *Viscum album*) σε ποντικούς

πάσχοντες από μελάνωμα και παρατήρησαν μια εκτεταμένη οξεία νέκρωση του όγκου συνοδευόμενη από ισχυρή φλεγμονή και οίδημα. Επίσης οι συγγραφείς κατέγραψαν ότι τα λεμφοκύτταρα των ποντικών που έλαβαν το εκχύλισμα του Ιξού παρουσίασαν μια ισχυρή απάντηση πολλαπλασιασμού *in vitro* όταν διεγέρθηκαν με κονκαναβαλίνη A, αλλά καλλιεργούμενα σε μέσον το οποίο περιείχε πλάσμα από τους ποντικούς που δέχτηκαν το εκχύλισμα. Αντιθέτως τα λεμφοκύτταρα τα προερχόμενα από τους μάρτυρες που δεν έλαβαν εκχύλισμα δεν ανταποκρίθηκαν στην μιτογόνα δράση της κονκαναβαλίνης A *in vitro*. Ακόμη τα μελανωματικά κύτταρα που εξετέθησαν στο εκχύλισμα υπήρξαν πολύ πιο ευαίσθητα προς την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων, σε σύγκριση προς τα μελανωματικά κύτταρα που χρησίμευσαν ως μάρτυρες, ειδικότερα δε παρουσία πλάσματος προερχομένου από τους ποντικούς που έλαβαν την μονοδόση του εκχυλίσματος. Το πλάσμα των ποντικών από μόνο του δεν επέδειξε κάποια κυτταροτοξική ιδιότητα.

Η ενδιαφέρουσα αυτή μελέτη υποδεικνύει ότι το εκχύλισμα του Ιξού, αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου προκαλώντας κάποιες τροποποιήσεις στις σχέσεις μεταξύ καρκινικού ιστού και ξενιστή. Ενδεχομένως η τροποποίηση αυτή σχετίζεται *1^{ov}*) με κάποια μεταβολή στην αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων, η οποία τα καθιστά ορατά απέναντι στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και *2^{ov}*) με μια παράλληλη αύξηση της κυτταροτοξικής δράσης των λεμφοκυττάρων του οργανισμού που φέρει τον όγκο. Τα ευρήματα αυτά είναι πολύ σημαντικά καθόσον υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως το εκχύλισμα του Ιξού φαίνεται να περιέχει παράγοντες οι οποίοι μεταβάλλουν την αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων αλλά και την κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων απέναντί τους, πράγμα το οποίο επαναφέρει την θεραπευτική ιδέα των αντικαρκινικών εμβολίων.

Ποια θα μπορούσαν να είναι τα συστατικά του εκχυλίσματος που επιφέρουν αυτή την εξαιρετικά ωφέλιμη μεταβολή της αντιγονικότητας των καρκινικών κυττάρων ;

Η απάντηση στο ερώτημα αυτό φαίνεται να έχει δοθεί από αρκετά χρόνια πριν. Τα δραστικά συστατικά των εκχυλισμάτων του Ιξού ενάντια στα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι είναι περισσότερα του ενός και οπωσδήποτε εκείνα τα οποία έχουν καλά τεκμηριωθεί αντιπροσωπεύονται από τρεις

διαφορετικές γλυκοπρωτεΐνες και συγκεκριμένα την λεκτίνη I, την λεκτίνη II και την λεκτίνη III (αντιστοίχως ML-I, ML-II και ML-III, όπου ML είναι τα αρχικά των λέξεων Mistletoe Lectins, δηλαδή λεκτίνες του Ιξού).

Το 1965 οι Vester F. και Nienhaus J. (381) δημοσιεύουν, στα Γερμανικά, ένα αξιολογικό άρθρο με τίτλο «Καρκινοστατικά πρωτεϊνικά συστατικά από το *Viscum album*». Με επί κεφαλής τον Vester F, το 1968 δημοσιεύονται ακόμη δύο εργασίες με τίτλους αντιστοίχως «Δεδομένα επί των ουσιών που περιέχονται στο *Viscum album*, IV. Βιολογική δράση διαφορετικών πρωτεϊνικών κλασμάτων» (382) και «Ανασταλτική επίδραση βασικών πρωτεϊνών του *Viscum album* επί της σύνθεσης του RNA σε κύτταρα ασκίτη του Yoshida» (383). Με τα δύο αυτά άρθρα προσδιορίζεται ότι το *Viscum album* περιέχει κυτταροτοξικές πρωτεΐνες στις οποίες αποδίδεται και η αντικαρκινική του δράση και ότι εκείνες που είναι βασικές είναι σε θέση να αναστείλουν την σύνθεση του RNA σε καρκινικά κύτταρα του λεγόμενου ασκίτη Yoshida.

Το 1977 μια άλλη ομάδα με επικεφαλής τον Luther P. δημοσιεύει στην Γερμανική γλώσσα ένα σημαντικό άρθρο το οποίο πραγματεύεται την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων του Ιξού, όπως επίσης τις συγκολλητικές και κυτταροτοξικές δράσεις των κλασμάτων τους επί καρκινικών κυττάρων ασκίτη ποντικού (384). Οι ερευνητές αναφέρουν την απομόνωση από το εκχύλισμα του Ιξού ενός κλάσματος που παρουσιάζει πλήρη συγκολλητική ικανότητα και ταυτοχρόνως υψηλή κυτταροτοξικότητα. Η απομόνωσή του κλάσματος αυτού έγινε μέσω χρωματογραφίας χημικής συγγένειας με την χρήση αντισωμάτων IgG συνδεδεμένων με γλουταραλδεΐδη. Το υπερκείμενο που ελήφθη μετά την χρωματογραφία και από το οποίο είχαν απομακρυνθεί πλέον οι πρωτεΐνες με την συγκολλητική και κυτταροτοξική ιδιότητα, εμφάνιζε μηδενική συγκολλητική δράση αλλά, επίσης και πολύ ισχυρή κυτταροτοξικότητα επί καρκινικών κυττάρων ασκίτη ποντικού. Η περαιτέρω προσθήκη αδιαλυτοποιημένων αντισωμάτων στο διάλυμα δεν επέφερε καμιά επιπρόσθετη επιρροή επί της τοξικής του δράσης. Η χρήση χρωματογραφίας με κυτταρίνη DEAE επέτρεψε τον διαχωρισμό συγκολλητικών κλασμάτων με τοξική δράση και μη συγκολλητικών κλασμάτων επίσης τοξικών. Τέλος η χρησιμοποίηση

χρωματογραφίας στήλης με Sephadex G 75 επέτρεψε τον διαχωρισμό των τοξικών συστατικών από τα συγκολλητικά συστατικά .

Το μοριακό βάρος της τοξίνης μετά την απομάκρυνση των λεκτινών ήταν 10 kDa.

Η λεκτίνη ήταν ικανή να προσδένεται στα καρκινικά κύτταρα ασκίτη του ποντικού πολύ πιο εύκολα από ό,τι στα ερυθροκύτταρα , εμφανίζοντας έτσι μια εκλεκτικότητα καθήλωσης και συνεπώς μια πιο στοχευμένη κυτταροτοξική δράση.

Η εργασία αυτή είναι σημαντική καθόσον διαχωρίζονται πλέον οι κυτταροτοξικές λεκτίνες από τις μη λεκτινικές κυτταροτοξικές πρωτεΐνες των εκχυλισμάτων του *Viscum album* και συνεπώς δίδεται η δυνατότητα του ξεχωριστού πειραματισμού με την πρώτη και την δεύτερη κατηγορία ουσιών. Πάντως αποδεικνύεται πλέον ότι οι αντικαρκινικές ιδιότητες του *Viscum album* είναι αποτέλεσμα μιας συνιστάμενης δράσης διαφορετικών ουσιών.

Το 1986 μια πολύ ενδιαφέρουσα εργασία δημοσιεύεται με πρώτο συγγραφέα των Luther P (385), ο οποίος ήταν επίσης ο πρώτος συγγραφέας της εργασίας που σχολιάσαμε μόλις προηγουμένως. Στην εργασία αυτήν η οποία έχει τον τίτλο «Είναι οι λεκτίνες του *Viscum album* ενδιαφέροντα εργαλεία για τις νόσους του πνεύμονα; Μια επισκόπηση πρόσφατων δεδομένων», δίνεται μια άλλη διάσταση των εν δυνάμει εφαρμογών των λεκτινών και όχι μόνον εκείνων του *Viscum album*.

Οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι τα δεδομένα που υπάρχουν στην διάθεσή τους δείχνουν ότι οι λεκτίνες διαφόρων φυτών (όπως των σπόρων του *Abrus*, του *Ricinus* και του *Viscum album*) είναι πρωτεΐνες δομικά σχετιζόμενες και είναι πιθανόν ομόλογες. Οι λεκτίνες παρουσιάζουν συνολικές ομοιότητες στις φυσικές, χημικές και βιολογικές τους ιδιότητες. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι ανοσολογικά στενά συνδεδεμένες και χαρακτηρίζονται από έναν υψηλό βαθμό διατήρησης των πρωτοταγών τους δομών υποδεικνύοντας έναν ρόλο σε βασικές οδούς κοινές σε όλα τα φυτά. Οι συγγραφείς παρουσιάζουν μεθόδους παρασκευής, καθαρισμού και χαρακτηρισμού των λεκτινών του Ιξού, όπως επίσης και συγκριτικές διασταυρούμενες αντιδράσεις με συγγενείς λεκτίνες της ομάδας των «τοξικών λεκτινών». Οι βιολογικές ιδιότητες των λεκτινών του Ιξού, ειδικά οι αντιδράσεις τους με τα φαγοκύτταρα (φαγοκυττάρωση), με τα βασεόφιλα

κοκκιοκύτταρα (απελευθέρωση ισταμίνης) και τα καρκινικά κύτταρα (αναστολή του πολλαπλασιασμού τους) παρουσιάζονται και συγκρίνονται με εκείνες που επιτυγχάνονται μέσω του αντικαρκινικού παρασκευάσματος Iscador του *Viscum album*.

Οι συγγραφείς υποδεικνύουν ότι όχι μόνον οι λεκτίνες του Ιξού, αλλά γενικότερο οι φυτικές λεκτίνες είναι ενδιαφέρουσες για τις δράσεις τους πάνω στον καρκίνο του πνεύμονα και πιθανόν γενικότερα στον καρκίνο του ανθρώπου και των ζώων, ανοίγοντας έτσι ένα πολύ μεγάλο και ανεκμετάλλετο κεφάλαιο στην φυσιοπαθολογία των αλληλεπιδράσεων φυτικών λεκτινών και καρκινοπαθούς οργανισμού.

Το εν λόγω άρθρο, κατά κάποιο τρόπο σηματοδοτεί μια «αλλαγή ποιότητας» στην έρευνα την σχετική με το *Viscum album* υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός κολοσσιαίου ντεπόζιτου πρωτεϊνικών ουσιών με χαρακτήρα λεκτίνης, οι οποίες θα μπορούσαν να μελετηθούν σε σχέση με τον καρκίνο, όπως επίσης και σε σχέση με την ικανότητά τους να ενσωματώνονται ειδικά σε ορισμένους τύπους κυττάρων και όχι σε οποιοδήποτε κύτταρο.

Αν αυτή η ιδιότητα της εκλεκτικής ενσωμάτωσης επί διαφόρων τύπων κυττάρων (και συνεπώς και διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων) είναι επιβεβαιώσιμη, τότε προκύπτει το δέλεαρ της επιλεκτικής στόχευσης των καρκινικών κυττάρων με πρωτεΐνες εξειδικευμένες για αυτά. Η σύνδεση ενός κυτταροτοξικού παράγοντα σε μια τέτοια πρωτεΐνη εκλεκτικής στόχευσης, θα μπορούσε να επιφέρει μια ανατροπή στην χημειοθεραπεία. Από την άλλη πλευρά η πρόσδεση μιας τέτοιας λεκτίνης εκλεκτικά σε έναν συγκεκριμένο τύπο καρκινικού ιστού, θα μπορούσε να αυξήσει την αντιγονικότητα του ιστού και να τον καταστήσει στόχο του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας έτσι στην παρασκευή εμβολίων και γενικά στην ανάπτυξη ονομαστικών μεθόδων ανοσολογικής καταπολέμησης του καρκίνου.

Αν και η προοπτική αυτή είναι πολύ ενδιαφέρουσα, εν τούτοις δεν μπορούμε να πούμε ότι ο προσανατολισμός της έρευνας κινήθηκε ισχυρά προς την κατεύθυνση αυτή. Ωστόσο, σιγά – σιγά συγκεντρώθηκε ένα σύνολο πληροφοριών οι οποίες, αν δεν επικυρώνουν, εν τούτοις φαίνεται να στηρίζουν σε κάποιο ποσοστό αυτή την δυνατότητα μοριακής εκλεκτικής στόχευσης των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα μέσω της χρήσης φυτικών λεκτινών, μεταξύ των οποίων εκείνες του *Viscum*

album κατέχουν ακόμη σημαντική θέση και συνεπώς το σχετικό με αυτές ενδιαφέρον εξακολουθεί να υφίσταται.

Σε μια εργασία ιστολογικού και παθολογοανατομικού προσανατολισμού, η οποία δημοσιεύτηκε το 1998 από τον Brinck U. (386) και τους συνεργάτες του και η οποία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Παθολογοανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Göttingen της Γερμανίας, οι ερευνητές διαπιστώνουν ότι είναι εφικτός ο εντοπισμός και ταυτοχρόνως η διαγνωστική διαφοροποίηση των αλλοιώσεων του παχέος εντέρου των οφειλομένων αφ' ενός σε μια τυπική φλεγμονή (όπως είναι η προκύπτουσα από μια σκωληκοειδίτιδα) και αφ' ετέρου σε ένα αδenoκαρκίνωμα του.

Η οξεία φλεγμονή της εντερικής βλεννογόνου βρέθηκε στην οξεία σκωληκοειδίτιδα να συνδέεται με εκλεκτικές αλλαγές της γλυκοζυλίωσης της μουκίνης στα goblet κύτταρα, κυρίως του κατώτερου και μέσου διαστήματος της κρύπτης καταλήγοντας σε μια αύξηση των σημείων πρόσδεσης τύπου DBA (*Dolichos biflorus* Αγλουτινίνη) - και SBA(Αγλουτινίνη της Σόγιας) - στον πληθυσμό των κυττάρων goblet. Η σκωληκοειδίτης προκαλεί μη επισημάνσιμη αλλοίωση της ενσωμάτωσης των νεογλυκοπρωτεϊνών. Αντίθετα στην περίπτωση του αδenoκαρκινώματος του παχέος εντέρου η καρκινική εξαλλαγή προκαλεί αύξηση των εκφραζόμενων στις κυτταρικές εξωτερικές επιφάνειες μορίων γαλακτοσακχαριτών (Gal, Gal-beta1, 3-GalNAc), μορίων φουκόζης, μορίων N-ακετυλγλυκοζαμίνης. Δεδομένου ότι τα εν λόγω μόρια αποτελούν σημεία πρόσδεσης των λεκτινών του *Viscum album*, του *Dolichos biflorus*, της *Helix pomatia*, της Αγλουτινίνης της σόγιας, προκύπτει ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να σημανθούν εξ αιτίας της πυκνότερης ενσωμάτωσης μορίων των λεκτινών που προαναφέραμε.

Αυτά τα δεδομένα είναι πολύ ενδιαφέροντα και μπορούν να στοιχειοθετήσουν μια νέα γραμμή έρευνας επί των λεκτινών του *Viscum album* αλλά και άλλων λεκτινών προερχομένων από μια μεγάλη σειρά φυτών, ή ασπόνδυλων ζώων. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι οι εν λόγω λεκτίνες ενσωματώνονται εκλεκτικά σε σάκχαρα της εξωκυτταρικής μεμβράνης των καρκινικών κυττάρων τα οποία ενδεχομένως ανήκουν σε εξειδικευμένους υποδοχείς τους, οι οποίοι όταν καταλαμβάνονται από εξειδικευμένα προς αυτούς μόρια πυροδοτούν την διαδικασία του αυτόματου κυτταρικού θανάτου. Οι εν λόγω υποδοχείς ονομάζονται υποδοχείς θανάτου

(death receptors). Υπάρχουν αρκετές εργασίες μοριακού προσανατολισμού οι οποίες δείχνουν ότι τόσο οι λεκτίνες όσο και οι βισκοτοξίνες του *Viscum album* δρουν επάγοντας διαδικασίες αυτόματου κυτταρικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα (αλλά και σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτών των εργασιών φαίνεται ότι οι λεκτίνες του *Viscum album* πυροδοτούν εκλεκτικά την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Έτσι σε μια μελέτη του δημοσιεύτηκε τον Δεκέμβριο του 2000 ο Park R. και οι συνεργάτες του αποδεικνύουν ότι η λεκτίνη II του Ιξού επάγει θάνατο κυττάρων μυελοβλαστικής λευχαιμίας της σειράς U937 μέσω θρυμματισμού του DNA δώδεκα ώρες μετά την χορήγησή της. Το ποσοστό της απόπτωσης βρίσκεται σε καλή συσχέτιση με την έντονη αύξηση της φωσφομεταφορικής δραστηριότητας της c-jun αμινοτελικής κινάσης 1 (JNK1) προς την αύξηση της ενεργοποιούμενης από το stress πρωτεϊνικής κινάσης (SAPK) των κυττάρων U937. Επί πλέον η χορήγηση των εκχυλισμάτων του *Viscum album* επάγει απόπτωση σε κύτταρα Jurkat και RAW 264.7, σε κύτταρα καρκίνου τραχήλου της μήτρας HL-60, σε κύτταρα DLD-1 καθώς και σε κύτταρα οξείας μυελοκυτταρικής λευχαιμίας.

Είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι στην εν λόγω δημοσίευση οι συγγραφείς δεν εντοπίζουν την αποπτωτική ιδιότητα των συστατικών του Ιξού μόνον στην λεκτίνη-II, αλλά τόσο στις υπόλοιπες δύο λεκτίνες I και III, όσο και στην βισκοτοξίνη (ιξοτοξίνη), καθώς και σε πολυσακχαρίτες του εν λόγω φαρμακευτικού φυτού. Επίσης είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι η απόπτωση η οποία επάγεται από την συγκεκριμένη λεκτίνη-II μπορεί να ανασταλεί από το πεπτίδιο αC-DEVD-CHO, υποδεικνύοντας ότι η όλη διαδικασία βρίσκεται υπό σαφή κυτταρικό ομοιοστατικό έλεγχο. Το γεγονός ότι ο Ιξός περιέχει ταυτοχρόνως πολλά συστατικά τα οποία ενεργοποιούν την αποπτωτική διαδικασία στα πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων και η απόδειξη της δράσης τους σε μοριακό επίπεδο, δηλαδή μέσω της ενεργοποίησης του αποπτωτικού μηχανισμού, αποδεικνύει ισχυρά τον αντικαρκινικό χαρακτήρα των εκχυλισμάτων αυτού.

Σε μια άλλη εργασία, η οποία δημοσιεύτηκε στο διεθνές έγκριτο περιοδικό Anticancer Research το 2000 από τον Bantel H. (387) και τους συνεργάτες του, γίνεται μια βαθύτερη διεξόδυση στον μηχανισμό ενεργοποίησης του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου: Εδώ οι συγγραφείς

ασχολήθηκαν κατά κύριο λόγο με την δράση της λεκτίνης-I , την οποία θεωρούν και ως τον ισχυρότερο ενεργοποιητή της απόπτωσης στα εκχυλίσματα του Ιξού. Οι συγγραφείς επισημαίνουν ότι στα αποπτωτικά φαινόμενα που προκαλεί η λεκτίνη-I έχουμε την ενεργοποίηση των κασπασών η οποία αποδεικνύεται από τα εξής δύο γεγονότα: 1^{ov}) ένα πεπτίδιο που αναστέλλει τις κασπάσες, προκαλεί ταυτοχρόνως και την πλήρη σχεδόν αναστολή του κυτταρικού θανάτου που εισάγει η λεκτίνη-I και 2^{ov}) από την σαφή παρατήρηση της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης της κασπάσης-8, της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3. Επειδή η κασπάση-8 αντιπροσωπεύει έναν ρυθμιστή της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από υποδοχείς θανάτου, οι συγγραφείς διερεύνησαν τη ενδεχόμενο της συμμετοχής ενός υποδοχέα θανάτου δια μέσου του οποίου ασκούνται οι δράσεις της λεκτίνης-I του *Viscum album*. Χρησιμοποιώντας σειρές κυττάρων ανθεκτικών στο CD95 και μη αντιδρώντων σε άλλους υποδοχείς θανάτου, μέσω της υπέρ-έκφρασης μιας επικρατούσας μετάλλαξης του FADD, οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι τα κύτταρα εξακολουθούσαν να αποθνήσκουν μετά την χορήγηση της λεκτίνης-I.

Έτσι έδειξαν ότι η λεκτίνη-I πυροδοτεί έναν υποδοχέα ελέγχου μιας οδού εισαγωγής της απόπτωσης ανεξάρτητης από τα μιτοχόνδρια. Επειδή η λεκτίνη-I αυξάνει την κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, τα δεδομένα αυτά είναι ιδιαίτερος σημαντικά καθόσον μπορούν να μας αποσαφηνίσουν την μοριακή βάση για την διεξαγωγή κλινικών μελετών στις οποίες να χρησιμοποιείται η εν λόγω λεκτίνη στην αντικαρκινική θεραπεία .Η εργασία αυτή αφαιρεί το αρνητικό επιχείρημα ότι οι κλινικές μελέτες για την δράση του Ιξού θα μπορούσαν να θέσουν σε κίνδυνο την ζωή των καρκινοπαθών, καθόσον μέσω των δεδομένων που εξάγονται προκύπτει ότι υπάρχει αύξηση του κυτταροστατικού αποτελέσματος και όχι μείωση, λόγω αλληλοαναίρεσης. Συνολικά οι εργασίες αυτές που περιστρέφονται γύρω από την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα καρκινικά κύτταρα υποδεικνύουν ότι στο *Viscum album* ισχύουν τα κάτωθι:

1^{ov}) Οι δραστικές κυτταροτοξικές ουσίες είναι τουλάχιστον τριών ειδών (λεκτίνες, ιξοτοξίνες και πολυσακχαρίτες).

2^{ov}) Οι λεκτίνες και τα άλλα ενεργά συστατικά του φυτού επάγουν τον μηχανισμό της απόπτωσης, ο οποίος ενδεχομένως συμπεριλαμβάνει

υποδοχείς θανάτου μεν, αλλά εμφανίζει και ανεξαρτησία από αυτούς, οπότε η δράση του λαμβάνει χώρα και σε επίπεδα κάτω από τον υποδοχέα.

3^ο) Ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο ακόμη και σε ανθεκτικές σειρές καρκινικών κυττάρων.

4^ο) Ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο σε αξιοσημείωτα πολλές σειρές καρκινικών κυττάρων.

5^ο) Ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των καθιερωμένων κυτταροστατικών ουσιών και δεν αναιρεί την δράση τους.

6^ο) Μερικές ποικιλίες Ιξού, όπως επίσης και το δένδρο-ξενιστής παράγουν πολύ ισχυρά κυτταροτοξικά συστατικά.

Όλα αυτά τα δεδομένα είναι ιδιαιτέρως χρήσιμα και ισχυρά για την διαστολή της έρευνας επί των εκχυλισμάτων του Ιξού και συγκεκριμένα:

- 1) Για την αποσαφήνιση των περαιτέρω δράσεων των εκχυλισμάτων του Ιξού,
- 2) Για την διερεύνηση όλων των ποικιλιών του στην Ευρωπαϊκή και Ασιατική Ήπειρο,
- 3) Για την διεξοδική μελέτη των συστατικών του εν λόγω φυτού που εξάγονται από Ιξούς επιφυομένους επί διαφορετικών ξενιστών,
- 4) Για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων των φυτών-ξενιστών του Ιξού.

Άλλες μελέτες οι οποίες έλαβαν χώρα κατά καιρούς από διάφορες ερευνητικές ομάδες τόσο της Ευρώπης, όσο και άλλων χωρών, έδειξαν ότι τόσο οι λεκτίνες όσο και άλλα συστατικά του Ιξού είναι σε θέση να ενισχύσουν την λειτουργικότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος των ασθενών που λαμβάνουν τα παρασκευάσματα του εν λόγω φυτού (388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402).

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι δράσεις του Ιξού επί των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος διαμεσολαβούνται μέσω της διαφοροποίησης της παραγωγής των κυτταροκινών, πράγμα το οποίο καταλήγει στην υψηλή ενεργοποίηση πολλών τύπων και υποπληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η συνολική ενίσχυση της κυτταρικής ανοσίας φαίνεται να αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο των δράσεων

των συστατικών του *Viscum album* επί του οργανισμού του ασθενούς, πράγμα το οποίο υποδεικνύει ότι η θεραπευτική χρήση του Ιξού και ενδεχομένως και η προληπτική χρήση αυτού, δεν περιορίζεται αναγκαστικά και μονοσήμαντα στον χώρο της θεραπείας των νεοπλασματικών νόσων, αλλά μπορεί κάλλιστα να διασταλεί και να συμπεριλάβει την αντιμετώπιση και πλείστων άλλων παθολογιών που σχετίζονται με την απορρύθμιση ή την κάμψη του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπό αυτή την έννοια νόσοι, όπως η ηπατίτιδα Β, η ηπατίτιδα C, ο έρπητας, η φυματίωση, η ελονοσία, οι λοιμώξεις των γερόντων, των νεογνών και των ατόμων με εξασθενημένο ή με μη ανεπτυγμένο ακόμη ανοσοποιητικό σύστημα θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με επιτυχή τρόπο μέσω της χρήσης των εκχυλισμάτων, αλλά και των απομονωμένων συστατικών του φυτού *Viscum album*.

Ενδεχομένως μια καλή εφαρμογή θα μπορούσε να λάβει χώρα για το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) τόσο στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, όσο και στα προχωρημένα στάδια αυτής, δεδομένου της υψηλής συχνότητας του σαρκώματος Carosi και των συνοδών λοιμώξεων που χαρακτηρίζουν το εν λόγω σύνδρομο.

Αν θεωρήσουμε ότι νόσοι, όπως η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας, προκύπτουν από φαινόμενα λυσογονίας ενός βραδέως ιού, σε κυτταρικές σειρές του οργανισμού (εν προκειμένου στα κύτταρα Swann της μυελίνης του ελύτρου) είναι πιθανόν ότι τα εκχυλίσματα του *Viscum album* να έχουν εν δυνάμει μια σπουδαία θέση στην αντιμετώπισή τους, τόσο κατά την φάση των ώσεων, όσο και στο μεσοδιάστημα το παρεμβαλλόμενο μεταξύ αυτών. Τέλος η χρήση του Ιξού ως αντιυπερτασικού παράγοντα θα μπορούσε, εν δυνάμει, να ερμηνευτεί εξ αιτίας της ικανότητάς του να κινητοποιεί την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ή από τα κύτταρα των ενδοθηλίων των αγγείων.

Η συνολική επισκόπηση της βιβλιογραφίας υποδεικνύει ότι το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τον Ιξό είναι περιορισμένο στα πλαίσια της γηραιάς Ευρωπαϊκής Ηπείρου με βασικό ερευνητικό άξονα τα Εργαστήρια και της Κλινικής κατά κύριο λόγο της Γερμανίας και της Κεντρικής Ευρώπης, γενικότερα. Η ερευνητική αυτή περιχαράκωση έχει μια ερμηνεία μάλλον οικονομικού και πολιτικού χαρακτήρα, καθόσον η Γερμανική Επιστήμη, μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο αντιμετωπίστηκε συνολικά με μια διάθεση

περιορισμού της εκ μέρους του Δυτικού, όσο και του Ανατολικού Κόσμου, η οποία ωστόσο, δεν έχει δικαιολογία στο να προεκτείνεται μέχρι σήμερα, ειδικότερα για ένα ζήτημα τόσο μεγάλης εμβέλειας όπως αυτό της ανάπτυξης των ερευνών επί του *Viscum album*.

B. *Abies alba*. Έλατο.

Το φυτό *Abies alba* ανήκει στην Οικογένεια Pinaceae και στην Τάξη Coniferales.

Περιλαμβάνει δέντρα μεγάλα, κωνικόμορφα, αειθαλή. Βελόνες προσφυόμενες πάνω στα κλαδιά με βάση πολύ ή λίγο κυκλικά πλατιά, που μετά την πτώση τους, αφήνουν μια κυκλική και επίπεδη ουλή. Στο επάνω μέρος έχουν ρηχό αυλάκι και στο κάτω τρίτο (προεξοχή), με λευκή γραμμή κι απ' τις δύο πλευρές της. Άνθη σε ίουλους. Αρσενικά στη βάση των ετήσιων βλαστών και στις μασχάλες των βελονών. Θηλυκά στην κορυφή των ετήσιων βλαστών, όρθια. Κώνοι με μονοετή ωρίμανση, όρθιοι και με καλυπτήρια που εξέρχουν από τα καρπικά λέπια. Τα καλυπτήρια και τα καρπικά λέπια πέφτουν μετά την ωρίμανση του καρπού (403).

Από τα 50 περίπου είδη του γένους *Abies*, στην Ευρώπη φύονται τα είδη: *Abies alba* (*A. pectinata*), *Abies cephalonica* και *Abies pinsapo*.

Από την διασταύρωση των δύο πρώτων ειδών, κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο, δημιουργήθηκε στα σημεία επαφής τους, ένας υβριδογενής πληθυσμός, που φέρει το όνομα *Abies alba* x *Abies cephalonica*, *populus hybridogenus* (*A. borisii regis* Mattf.). Στη χώρα μας φύονται τα δύο πρώτα είδη και το υβρίδιό τους (403).

***Abies alba* Mill (*A. pectinata* Lam & D.C.) Ελάτη λευκή ή χτενοειδής**

Βελόνες: Ακρόκοιλες, μήκους 15 – 30 mm και πλάτους 2 – 3 mm, στιλπνές. Στα πλευρικά κλαδιά και στα κλαδιά που σκιάζονται, οι βελόνες είναι τοποθετημένες σε δύο σειρές, σαν χτένια (γι' αυτό ονομάζεται *pectinata*), ενώ στα κλαδιά της κορυφής έχουν σπειροειδή διάταξη. Οι ρητινοφόροι αγωγοί δεν εφάπτονται στην επιδερμίδα και το υπόδερμα είναι λεπτό και διακόπτεται σε πολλά σημεία από στόματα. Διάρκεια ζωής 8 – 11 χρόνια.

Οφθαλμοί: Ωοειδείς, χωρίς ρητίνη, εκτός από τους οφθαλμούς της κορυφής που έχουν λίγη. Είναι τοποθετημένοι ανά τρεις, σπάνια ανά τέσσερις και σχηματίζουν πραγματικούς σπονδύλους. Πολλοί οφθαλμοί μένουν κοιμώμενοι.

Κλαδίσκοι: Οι ετήσιοι σταχτόχρωμοι και με καστανωπά τριχίδια.

Άνθη: Μονογενή. Φυτό μόνοικο. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι, ενώ τα θηλυκά όρθια, ωχροπράσινα, μορφής κωνίσκων. Άνθηση Απρίλιο – Μάιο.

Κώνιοι: Κυλινδρικοί, ανοιχτοκαστανοί, μήκους 10 – 16 cm, με κορυφή ελαφρά κωνική. Δεν είναι περιχυμένοι με ρητίνη. Καρπόφυλλα με σφηνοειδή βάση και πλατιά στρογγυλεμένη κορυφή. Καλυπτήρια ταινιοειδή. Ωρίμανση Σεπτέμβριο – Οκτώβριο του χρόνου ανθήσεως. Πτώση σπερμάτων αμέσως μετά την ωρίμανση.

Σπέρματα: Τριγωνικά με κύστες αιθέριων ελαίων και καστανοιώδες πτερύγιο που τα περιβάλλει σαν χλαμύδα (μανδύας).

Κοτυληδόνας: Όπως και στην Κεφαλληνιακή ελάτη.

Γενική περιγραφή: Δέντρο ύψους 30 – 40 m, σπάνια 50 m και διαμέτρου 1 m, όμοιο με την Κεφαλληνιακή ελάτη. Το όνομα «λευκή» ελάτη (*Abies alba*) προέρχεται από το σταχτόλευκο χρώμα του φλοιού.

Βιολογικές απαιτήσεις: Χρειάζεται βαθύ, γόνιμο, χαλαρό, υγρό έδαφος και μεγάλη υγρασία αέρα. Είναι σκιανθεκτικό είδος και σε νεαρή ηλικία πολύ ευαίσθητο σε όψιμους παγετούς.

Γεωγραφική εξάπλωση: Σχηματίζει δάση στη Γαλλία, Ιταλία, Ελβετία, Αυστρία, Γερμανία, Βαλκανική χερσόνησο κ.α. Στην Ελλάδα εμφανίζεται σποραδικά κατά μήκος των βορείων συνόρων (403).

***Abies cephalonica* (Loud) Ελάτη Κεφαλληνιακή**

Βελόνες: Έντονα ή ελαφρά οξυκόρυφες, μήκους 15 – 28 mm και πλάτους 2 mm, στιλπνές. Έχουν σπειροειδή διάταξη και μόνο σε κλαδιά που σκιάζονται και σε νεαρά φυτά είναι δίσειρες. Οι ρητινοφόροι αγωγοί εφάπτονται στην επιδερμίδα και το υπόδερμα είναι παχύ και κλειστό. Έχουν διάρκεια ζωής 10 – 12 χρόνια.

Οφθαλμοί: Ωοειδείς, οξείς, περιχυμένοι με πολύ ρητίνη, συνήθως ανά τέσσερις, σχηματίζουν πραγματικούς σπονδύλους.

Κλαδίσκοι: Οι ετήσιοι είναι τελείως γυμνοί, γυαλιστεροί, καστανωποί.

Άνθη: Μονογενή. Φυτό μόνοικο. Τα αρσενικά είναι κόκκινοι ίουλοι, ενώ τα θηλυκά όρθια, κιτρινοπράσινα, μορφής κωνίσκων. Άνθηση Μάιο – Ιούνιο.

Κώνοι: Κυλινδρικοί, πρασινοκαστανοί, με κορυφή κωνική (οξεία), μήκους 12 – 20 cm, περιχυμένοι με πολλή ρητίνη. Καρπόφυλλα με σφηνοειδή βάση, προς τα πάνω πλατιά στρογγυλεμένα. Καλυπτήρια σφηνοειδή. Ωρίμανση Σεπτέμβριο – Οκτώβριο του χρόνου ανθήσεως. Πτώση σπερμάτων αμέσως μετά την ωρίμανση.

Σπέρματα: Τριγωνικά ωοειδή, ανοιχτά καστανόχρωμα, με κύστες αιθέριων ελαίων και ξανθόχρωμο πτερύγιο που τα περιβάλλει σαν χλαμύδα (μανδύας).

Κοτυληδόνες: 4 – 8, συνήθως 5, σε σπόνδυλο με οριζόντια διεύθυνση, επίπεδες, οξυκόρυφες ή αμβλυκόρυφες, με δύο λευκές γραμμές στην πάνω επιφάνεια. Οι πρώτες βελόνες είναι μικρότερες και έχουν δύο λευκές γραμμές στην κάτω επιφάνεια. Αναπτύσσονται σχεδόν ανάμεσα στις κοτυληδόνες, πάνω σε πολύ βραχύ βλαστό.

Γενική περιγραφή: Δέντρο ύψους 15 – 30 m και διαμέτρου 0,80 m, με οριζόντια κλαδιά. Φλοιός με ρητινοκύστες, στην αρχή λείος, καστανωπός, αργότερα σταχτόλευκος. Το ξηρόφλοιο απολεπίζεται σε γωνιώδη λέπια.

Βιολογικές απαιτήσεις: Απαιτεί βαθύ γόνιμο, χαλαρό και σχετικά υγρό έδαφος. Μπορεί να αναπτυχθεί σε αβαθή και ξηρότερα εδάφη, ιδίως σε ασβεστολιθικά πετρώματα, γιατί οι ρίζες εισχωρούν βαθιά μέσα στις ρωγμές και εξασφαλίζουν τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες. Είναι σκιανθεκτικό είδος, αλλά λιγότερο από τον ίταμο.

Γεωγραφική εξάπλωση: Είδος της Ελληνικής χλωρίδας, σχηματίζει αμιγείς συστάδες από τον Ταΰγετο ως τον Τυμφρηστό και την Οξιά, ενώ βορειότερα, μέχρι τον Όλυμπο και την Άθωνα, μικτές με την υβριδογενή ελάτη (403).

Abies alba* x *Abies cephalonica*, *populus hybridogenus

(*A. borisii regis* Mattf.) Ελάτη υβριδογενής

Βελόνες: Στα κατώτερα κλαδιά ελαφρά οξυκόρυφες ή με εντομή, μήκους 30 mm και πλάτους 2 – 3 mm. Στα ανώτερα κλαδιά είναι οξυκόρυφες και μεγαλύτερες (στο Άγιο Όρος ο Mattfeld διέκρινε το 1930 την ποικιλία *A.*

borissi regis var. pseudocilicica με μακριές και μαλακές βελόνες). Υπόδημα σε άλλα δέντρα παχύ και κλειστό και σε άλλα λεπτό και διακεκομμένο.

Οφθαλμοί: Ωοειδείς, περιχυμένοι με λίγη ρητίνη, σχηματίζουν πραγματικούς σπονδύλους.

Κλαδίσκοι: Οι ετήσιοι κλαδίσκοι πιληματώδεις, ανοιχτοκίτρινοι.

Άνθη: Μονογενή. Φυτό μόνοικο. Τα αρσενικά είναι κιτρινοϊόχρωμοι ίουλοι, ενώ τα θηλυκά όρθια, κιτρινοπράσινα, μορφής κωνίσκων. Άνθηση Απρίλιο – Μάιο.

Κώνιοι: Κυλινδρικοί, μήκους 15 cm περίπου, ποικιλόχρωμοι, με ελαφρά κωνική κορυφή. Είναι περιχυμένοι με λίγη ρητίνη. Τα καρπόφυλλα και τα καλυπτήρια έχουν ενδιάμεση μορφή σε σχέση με τη λευκή και την Κεφαλληνιακή ελάτη. Ωρίμανση Σεπτέμβριο – Οκτώβριο του χρόνου ανθήσεως. Πτώση σπερμάτων αμέσως μετά την ωρίμανση.

Σπέρματα: Τριγωνικά ωοειδή, ανοιχτά καστανόχρωμα, με κύστες αιθέριων ελαίων και πτερύγιο που τα περιβάλλει σαν χλαμύδα (μανδύας).

Κοτυληδόνες: Όμοιες με τα προηγούμενα είδη.

Γενική περιγραφή: Είναι δέντρο ύψους 20 – 35 m και διαμέτρου 0,70 – 1 m, με κόμη πλατιά κωνική και κλαδιά λιγότερο πυκνά από την Κεφαλληνιακή ελάτη. Φλοιός σε νεαρή ηλικία καστανοσταχτόχρωμος, σε μεγάλη ηλικία με σταχτόλευκο ξηρόφλοιο. Η ελάτη αυτή θεωρείται ότι δεν είναι ένα ορισμένο είδος, αλλά πληθυσμός υβριδίων που προήλθε από διασταύρωση μεταξύ λευκής και Κεφαλληνιακής ελάτης την τελευταία παγετώδη περίοδο.

Βιολογικές απαιτήσεις: Επειδή είναι υβριδογενής πληθυσμός, οι βιολογικές απαιτήσεις άλλοτε πλησιάζουν προς την λευκή και άλλοτε προς την Κεφαλληνιακή ελάτη.

Γεωγραφική εξάπλωση: Στη Ν. Βουλγαρία και Ν. Γιουγκοσλαβία. Στην Ελλάδα, σποραδικά στην Πελοπόννησο, στον Τυμφρηστό και στην Οξιά και από εκεί βορειότερα ως τα σύνορα, αμιγής ή σε μικτές συστάδες (403).

Στο Παράρτημα III (Σελίδα 383) βρίσκονται φωτογραφίες των υπό εξέταση φυτών (*Viscum album* & *Abies alba*) (Φωτογραφίες 51 – 52 – 53 – 54 – 55).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ IN VITRO ΚΑΙ IN VIVO.

Α. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Δεδομένου ότι το αντικείμενο της μελέτης των βιολογικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων ενός φυτού είναι πολύ εκτεταμένο, η ανάληψη της εκπόνησης της ανά χείρας διατριβής επέβαλε την αναζήτηση μιας ερευνητικής στρατηγικής ευέλικτης και ταυτόχρονα ικανής να απαντήσει στα βασικά ερωτήματα που τέθηκαν ευθύς εξ αρχής, χωρίς να ξεφύγει από τα όρια ενός επιστημονικού μινιμαλισμού, που ευθύς εξ αρχής τέθηκε εξ αιτίας της στενότητας των διατιθέμενων μέσων και κυρίως της οικονομικής τους συνιστώσας.

Δεδομένου ότι στην παρούσα περίπτωση είχαμε να εξετάσουμε τις αντικαρκινικές ιδιότητες δύο συνεργούντων φυτικών οργανισμών, δηλαδή δύο φυτών τα οποία συμβιώνουν, η τήρηση αυτής της οικονομικότητας ήταν περισσότερο σφιχτή και αναπόδραστη, διαφορετικά υπήρχε ο κίνδυνος να μην απαντηθεί με επάρκεια κανένα από τα τιθέμενα ερωτήματα.

Έτσι λοιπόν θέσαμε τα εξής ερωτήματα:

- 1^ο) Έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες τα δύο συνεργούντα φυτά *Viscum album* + *Abies alba* ;
- 2^ο) Έχουν αντικαρκινογόνες ιδιότητες ;
- 3^ο) Είναι σε θέση να επηρεάσουν την ανοσολογική απάντηση ενός οργανισμού;
- 4^ο) Είναι σε θέση να επηρεάσουν την μεταστατική διασπορά και μέσω ποιου μηχανισμού;

5^{ον}) Διαθέτουν κάποιο θεμελιώδες χημικό χαρακτηριστικό το οποίο να δικαιολογεί κατά βάση τις όποιες βιολογικές τους δράσεις κατά του καρκίνου;

6^{ον}) Τροποποιούν κάποιον θεμελιώδη μεταβολισμό ο οποίος ευθύνεται για μια πλειάδα φαινομένων συνδεδεμένων στενά στο πλαίσιο της οντότητας του καρκινικού κυττάρου και του οργανισμού που αποτελεί τον φορέα και ξενιστή του;

7^{ον}) Ποια μέρη των δύο φυτών περιέχουν τα βιολογικώς δραστικά συστατικά;

Έχοντας σταθερά μπροστά μας αυτά τα ερωτήματα καθίσαμε και επεξεργαστήκαμε μια ερευνητική στρατηγική προκειμένου να δώσουμε το ταχύτερο απαντήσεις σαφείς, προκύπτουσες μέσα από επαναλήψιμα και σταθερά δεδομένα, με την δυνατότερη συμπίεση του οικονομικού κόστους.

Έτσι λοιπόν αποφασίσαμε να δημιουργήσουμε μέσω χημικής καρκινογένεσης, δια του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα 3,4 – βενζοπυρενίου (B[a]P), κακοήθεις όγκους σε συγγενείς επίμυες Wistar και από έναν εξ αυτών να απομονώσουμε καρκινικά κύτταρα τα οποία θα χρησιμοποιούσαμε κατόπιν ως εξής:

1^{ον}) Υπό την μορφή κυτταρικών καλλιεργειών *in vitro* προκειμένου να διαπιστώσουμε αν και ποια από τα εκχυλίσματα των φυτών είχαν αντικαρκινικές ιδιότητες, δηλαδή φόνευαν τα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντάς μας ταυτόχρονα να εξάγουμε την δόση που θανατώνει το ήμισυ του κυτταρικού πληθυσμού στο τρυβλίο (IC₅₀), όπως επίσης και την ελάχιστη δόση που θανατώνει όλο τον κυτταρικό πληθυσμό του τρυβλίου.

Η εξαγωγή των δεδομένων αυτών ήταν απαραίτητη κατ' αρχάς για να διαπιστώσουμε αν υπήρχε όντως αντικαρκινική δράση στα εκχυλίσματα και εν συνεχεία για να προσδιορίσουμε την δοσολογία την οποία έπρεπε κατόπιν να χρησιμοποιήσουμε στα *in vivo* πειράματα, τα οποία ήσαν περισσότερο περίπλοκα και βεβαίως πλέον ουσιαστικά για την καταξίωση ενός αντικαρκινικού παράγοντα προς έναν ορίζοντα θεραπευτικής χρησιμοποίησης και στον άνθρωπο.

2^{ον}) Για τον ενοφθαλμισμό μεγάλου αριθμού καρκινικών κυττάρων σε υγιείς επίμους Wistar, συγγενείς προς τον επίμου στον οποίον δημιουργήθηκε ο κακοήθης όγκος από τον οποίον ελήφθησαν τα καρκινικά κύτταρα. Η μεθοδολογία αυτή μας έδινε ένα πλεονέκτημα καθόσον ενοφθαλμίζοντας μεγάλους αριθμούς καρκινικών κυττάρων προερχομένων από συγγενή επίμου, σε άλλους επίμους, μπορούσαμε να έχουμε μέσα σε μικρούς χρόνους έναν μεγάλο αριθμό καρκινοπαθών ζώων με ευμεγέθεις όγκους, ή εν γένει όγκους όλων των μεγεθών, προκειμένου να μελετήσουμε τις αντικαρκινικές δράσεις του εκχυλίσματος σε πλήρεις οργανισμούς και σε διαφορετικά στάδια της νόσου, από τα πλέον αρχικά, μέχρι τα ακροτελεύτια.

Φυσικά η μέθοδος αυτή μας έδινε επίσης το πλεονέκτημα να ελαχιστοποιήσουμε την χρήση ενός ιδιαίτερα σκληρού καρκινογόνου παράγοντα (του 3,4-βενζοπυρενίου), ο οποίος είναι δυνατόν να εκθέσει σε κίνδυνο και τον πειραματιστή, αν παρ' ελπίδα συμβεί κάποιος εσφαλμένος χειρισμός ή μια αστοχία στην χρήση των υλικών. Επίσης η οικονομικότητα των πειραμάτων αποκτούσε ένα καλύτερο μέγεθος για το περιορισμένο μας κεφάλαιο κίνησης, μέσω της υιοθέτησης αυτής της μεθόδου.

Είναι φανερό ότι με την μέθοδο του ενοφθαλμισμού μπορούσε κανείς να μελετήσει την τελική φάση της διαδικασίας της εξέλιξης του καρκίνου, δηλαδή την προώθηση (progression), ενώ οι υπόλοιπες δύο φάσεις, της έναρξης και της προαγωγής (initiation and promotion) δεν μπορούσαν να μελετηθούν στο μοντέλο αυτό, πράγμα επιθυμητό για τους στόχους μας. Εδώ θα μπορούσαμε να πειραματιστούμε σε όλα τα μεγέθη του φορτίου των καρκινικών κυττάρων (από μερικές χιλιάδες κύτταρα, μέχρι πολλά εκατομμύρια αυτών), όπως επίσης και με όλα τα μεγέθη των κακοηθών όγκων.

Για να έχει επιτυχία το μοντέλο μας χρησιμοποιήσαμε μια σειρά ομοικτικών επίμους Wistar, δηλαδή πειραματόζωα τα οποία είχαν προκύψει από συνεχείς αλληλοδιάδοχες διασταυρώσεις μεταξύ αδελφών. Έχοντας συνεπώς ζώα με υψηλή γενετική ομοιογένεια, θα μπορούσαμε να αποφύγουμε την ανοσολογική απόρριψη των ενοφθαλμιζόμενων καρκινικών κυττάρων.

Η καρκινογένεση δια του 3,4 – βενζοπυρενίου έγινε σε μερικά ζώα της τρίτης γενεάς, προκειμένου να λάβουμε τον κακοήθη όγκο από τον οποίον θα

απομονώναμε ακολούθως τα καρκινικά κύτταρα για τους επί μέρους πειραματισμούς. Μετά την ανάπτυξη των όγκων, την απομόνωση καρκινικών κυττάρων και την επιτυχή τους καλλιέργεια και πολλαπλασιασμό, ώστε να έχουμε μεγάλα αποθέματα για χρήση, επιλέξαμε για τους ενοφθαλμισμούς τα κύτταρα ενός λειομυοσαρκώματος τα οποία παρουσίαζαν πολύ υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, καθώς και πολύ μικρή διαφοροποίηση. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν επίσης και για την *in vitro* μελέτη στην κυτταρική καλλιέργεια, όπως επίσης και για τα πειράματα τα σχετικά με την μετάσταση, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* επίπεδο.

Επίσης τα ίδια κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για έναν αριθμό πειραμάτων ανοσολογικού χαρακτήρα όπου μελετήθηκε, *in vitro*, η δράση του εκχυλίσματος των φυτών σε φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα (NK cells). Στην περίπτωση αυτή τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμυος χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα – στόχοι προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα του εκχυλίσματος να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα. Επίσης εδώ χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα στόχοι και τα κύτταρα της ερυθρολευχαιμικής σειράς K-562 του ανθρώπου, προκειμένου να στηριχθούν καλύτερα τα κυτταροτοξικά δεδομένα που ενδεχομένως προέκυπταν.

Η χρησιμοποίηση των κυτταρικών καλλιεργειών των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμυ Wistar, όπως επίσης και το *in vivo* μοντέλο ανάπτυξης καρκίνου σε επίμυες Wistar, μέσω ενοφθαλμισμού, επαρκούσαν για να δώσουν απάντηση στο πρώτο ερώτημα που είχαμε θέσει, δηλαδή στο κατά πόσον τα εκχυλίσματα των δύο φυτών είχαν αντικαρκινικές ιδιότητες. Η απάντηση αυτή γινόταν όμως πληρέστερη αν χρησιμοποιούσαμε και μια ομάδα επίμυων οι οποίοι είχαν αναπτύξει καρκίνο μέσω χορήγησης 3,4 – βενζοπυρενίου και συνεπώς είχαν δεχθεί όλες τις δράσεις ενός τυπικού και ισχυρού καρκινογόνου σε όλα τους τα συστήματα, συμπεριλαμβανομένου και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η επέκταση αυτή έγινε με κύριο γνώμονα την ύπαρξη μερικών βιβλιογραφικών αναφορών οι οποίες υποδείκνυαν ότι ένα μέρος της δράσης των χημικών καρκινογόνων οφείλεται και στην εμμένουσα ανοσοκαταστολή που αυτά προκαλούν. Επίσης ένα ζώο που δέχεται την μαζική δράση μιας υψηλής δόσης ενός καρκινογόνου, αναγκαστικά περνά μέσα από όλες τις

φάσεις της χημικής καρκινογένεσης και όχι μόνον από την προώθηση, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ανάπτυξης όγκων δια ενοφθαλμισμού.

Έτσι, δηλαδή, μπορούσαμε να έχουμε μια πλήρη εικόνα, εντάσσοντας μέσα στα πειράματά μας και οργανισμούς οι οποίοι είχαν υποστεί την εξαιρετικά υψηλή καταπόνηση (stress) ενός ακραίου μοντέλου χημικής καρκινογένεσης, όπως αυτό που αναπτύξαμε και χρησιμοποιούμε από τριακονταετίας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας.

Είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι ένας οργανισμός που υφίσταται χημική καρκινογένεση σε χρόνια βάση, δεν υφίσταται απλώς μια μετάλλαξη σε τοπικό επίπεδο, η οποία καταλήγει στην δημιουργία μιας αρχικής καρκινικής αποικίας, αλλά και μια διαδικασία ανοσοποιητικής υποβάθμισης, ώστε να μην είναι σε θέση να φονεύσει τα καρκινικά κύτταρα. Επίσης ο ίδιος ο όγκος φαίνεται ότι δρα επί του ξενιστή, κάμπτοντας τις δυνάμεις αντίστασής του. Συνεπώς η χρήση των καρκινοπαθών ζώων μέσω βενζοπυρενίου, αντικατόπτριζε καλύτερα την πραγματικότητα ενός καρκινοπαθούς που είχε αναπτύξει όγκο εξ αιτίας περιβαλλοντικής ρύπανσης χημικού χαρακτήρα.

Για να απαντήσουμε στην δεύτερη ερώτηση, δηλαδή στο κατά πόσον το εκχύλισμα των δύο φυτών έχει αντικαρκινογόνες ιδιότητες, δηλαδή είναι σε θέση να εξουδετερώσει ένα χημικό καρκινογόνο, όπως το 3,4-βενζοπυρένιο, χρησιμοποιήσαμε την τακτική μιας επώασης του εκχυλίσματος με το βενζοπυρένιο, υπό συνθήκες εργαστηρίου σε υδατόλουτρο.

Παλαιότερα πειράματα που είχαν διεξαχθεί από άλλους ερευνητές του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, είχαν χρησιμοποιήσει την τακτική της επώασης του 3,4-βενζοπυρενίου με διάφορες ουσίες οι οποίες ελέγχονταν για το αν κατείχαν αντικαρκινογόνες ιδιότητες. Οι ουσίες αυτές ήσαν κατά κύριο λόγο ακόρεστα λιπαρά οξέα, οξέα του κύκλου του Krebs, θειολικές ενώσεις, πολυαμίνες και αντιοξειδωτικά.

Τα παλαιά αυτά πειράματα είχαν δείξει ότι η επώαση συχνά επέφερε διαφόρων βαθμών μείωση της καρκινογόνου δράσης του 3,4-βενζοπυρενίου. Συχνά η μείωση της καρκινογόνου δράσης συνοδευόταν και από πτώση του φθορισμού του βενζοπυρενίου. Στα πειράματα αυτά η ποσότητα του υπό δοκιμή καρκινογόνου ετίθετο υπό συγκεκριμένη γραμμομοριακότητα, ώστε να

προκύψουν πληροφορίες σχετικές με τον μηχανισμό της αντίδρασης, αλλά και την στοιχειομετρία της, η αποσαφήνιση της οποίας επίσης συνεισφέρει στην κατανόηση του εν λόγω μηχανισμού. Στα παλαιά αυτά πειράματα φαινόταν ότι η πτώση του φθορισμού σήμαινε καταστροφή των διπλών δεσμών του συγκεκριμένου καρκινογόνου και συνεπώς αλλοίωση του μορίου του, πράγμα το οποίο είχε μεγάλη επίπτωση στις καρκινογόνες ιδιότητες, προς την κατεύθυνση της μείωσής τους.

Σύμφωνα με την γενικώς παραδεκτή σημερινή θεωρία περί μοριακής ιδιαιτερότητας των χημικών καρκινογόνων, όσον αφορά τους Πολυκυκλικούς Αρωματικούς Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ), στους οποίους εντάσσεται και το 3,4-βενζοπυρένιο, η καρκινογόνος δράση συνδέεται με την ύπαρξη δύο συγκεκριμένων περιοχών στο μόριο του καρκινογόνου: της περιοχής K (καρκινοφόρος ομάδα ή K region) και της περιοχής L (Bay region ή μοριακός όρμος). Η παρουσία των δύο αυτών περιοχών θεωρείται απαραίτητη προκειμένου ένας ΠΑΥ να είναι καρκινογόνος.

Η βασική θεωρητική γραμμή που είχε ακολουθηθεί από τους πειραματιστές του Εργαστηρίου Φυσιολογίας ήταν ότι τα υποψήφια αντικαρκινογόνα μόρια μπορούσαν είτε να δώσουν υδρογόνα, είτε άλλες χημικές ομάδες, οι οποίες θα μπορούσαν να κάνουν αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς της περιοχής K, όπως επίσης και της περιοχής L. Η περιοχή K, ωστόσο φαίνεται ότι είναι πιο προσιτή από τα αντικαρκινογόνα μόρια καθόσον είναι εκτεθειμένη σε μια εξωτερική πλευρά του καρκινογόνου μορίου. Αντιθέτως η περιοχή L, βρίσκεται σε μια εσοχή του μορίου του καρκινογόνου, δίκην «όρμου», οπότε η πρόσβαση του αντικαρκινογόνου μορίου είναι σαφώς δυσκολότερη, σε σύγκριση με ό,τι ισχύει για την περιοχή K, λόγω στερικού εμποδισμού. Σε αυτή την προστατευμένη περιοχή μπορούν ευκολότερα να εισέλθουν μικρού μεγέθους μόρια, όπως π.χ οι ρίζες του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου του οξυγόνου ($\text{O}\cdot^{-2}$), ρίζες υδριδίου ($\text{H}\cdot$), κ.α.

Ωστόσο ακόμη και μόνον η προσθήκη στην περιοχή K ατόμων ή μορίων αρκεί για να μειώσει τα χαρακτηριστικά του καρκινογόνου μορίου και συνεπώς την καρκινογόνο του δράση. Προφανώς η χρήση ενός αντικαρκινογόνου μορίου, σε περίσσεια, ως προς το 3,4-βενζοπυρένιο, θα

αρκούσε να αλλοιώσει ισχυρά το μόριο του τελευταίου ελαττώνοντας και την καρκινογόνο του δράση.

B. ΣΥΛΛΟΓΗ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* και *Abies alba* ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.

Οι συλλογές των φυτών *Viscum album* και *Abies alba*, για την παρασκευή των αλκοολικών εκχυλισμάτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έγιναν σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια του έτους κι αυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο, προερχόταν από φθινοπωρινές συλλογές. Αυτό που παρατηρήθηκε, είναι ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν γενικά από τις συλλογές του μηνός Νοεμβρίου, έδωσαν τα πιο αξιόλογα δεδομένα, γιατί τη συγκεκριμένη περίοδο οι δραστηριότητες των εκχυλισμάτων που προήλθαν από τα αντίστοιχα τμήματα των δύο φυτών και κυρίως από το *Viscum album*, χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα σημαντικά, με υψηλή κυτταροτοξικότητα (όπως αποδείχθηκε), λόγω της πλήρους ωρίμανσης των καρπών του εν λόγω φυτού.

Η συλλογή πραγματοποιήθηκε από φυτά τα οποία εντοπίστηκαν σε διάφορες περιοχές του νομού Ιωαννίνων, στον ορεινό όγκο της Πίνδου και σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1000 m, μιας κι ο ξενιστής μας είναι το *Abies borisii regis* (υβρίδιο μεταξύ *Abies alba* x *Abies cephalonica*). Η πρόσβαση στις εκάστοτε περιοχές, γινόταν με ιδιαίτερη δυσκολία τις περισσότερες φορές (χρήση ειδικού οχήματος – πεζοπορία - αναρρίχηση), λόγω της ιδιομορφίας του εδαφικού ανάγλυφου και της έντονης εδαφικής κλίσης.

Η σύσταση του εδαφικού υποστρώματος, χαρακτηρίζεται ως ασβεστολιθική.

Συνήθως συνέλεγα τα πιο μεγάλα και εύρωστα φυτά του *Viscum album*, τα οποία κατανέμονταν στα ψηλότερα επάκρια τμήματα του ξενιστή (*Abies alba*) και ιδιαίτερα στις ηλιόλουστες πλευρές του, γεγονός που υποδηλώνει την αναγκαστική ανάβαση στα δέντρα για τη λήψη των δειγμάτων, με υψηλό βαθμό επικινδυνότητας και κίνδυνο της σωματικής μας ακεραιότητας.

Για τη λήψη των φυτικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν κλαδευτικά πριόνια και κλαδευτικά ψαλίδια ανοξειδωτα και οι τομές γινόταν απότομες και καθαρές.

Τα φυτά αμέσως μετά την κοπή τους, τοποθετούνταν σε μαύρες πλαστικές σακούλες και μεταφέρονταν στο ψυκτικό θάλαμο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (4 °C), μέχρι την πλήρη επεξεργασία τους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι συλλογές Νοεμβρίου έγιναν οριακά, όσον αφορά τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στις συγκεκριμένες περιοχές (δριμύ ψύχος – έντονες χιονοπτώσεις), γεγονός που υποβαθμίζει τη ποιότητα των φυτών και δυσκολεύει περισσότερο την πρόσβαση.

Αρχικά έγινε ποιοτικός έλεγχος (τελική διαλογή) και καθαρισμός των φυτών με άφθονο νερό και εν συνεχεία απλώθηκαν στο πάγκο επάνω σε απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσουν.

Εν συνεχεία έγινε διαχωρισμός των φυτών και έτσι δημιουργήθηκαν τρεις κατηγορίες: α) φυτά *Viscum album*, β) φυτικά τμήματα *Abies alba* και γ) σημεία συνέργιας μεταξύ των δύο φυτών.

Η αρχική σκέψη ήταν να διαχωριστούν κάθε ένα από τα δύο φυτά σε διάφορα επί μέρους τμήματα και πιο συγκεκριμένα σε φύλλα, βλαστούς, καρπούς, φλοιό, ξύλο και συνέργια των δύο φυτών.

Έτσι δημιουργήθηκαν αλκοολικά εκχυλίσματα των παρακάτω φυτικών τμημάτων: α) καρποί – φύλλα – βλαστοί από το φυτό *Viscum album*, β) φύλλα – φλοιό – ξύλο από το φυτό *Abies alba* και γ) σημεία συνέργιας μεταξύ των δύο φυτών. Επομένως δημιουργήθηκαν συνολικά επτά διαφορετικά είδη αλκοολικών εκχυλισμάτων.

Με αυτή τη στρατηγική, είχαμε τη δυνατότητα να ελέγξουμε τη δυναμική του κάθε φυτικού τμήματος απέναντι σε λειομυοσαρκωματικά κύτταρα, αρχικά σε cocktail από τα πιο ισχυρά φυτικά τμήματα των δύο φυτών, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σε όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Όπως αντιλαμβάνεται κανείς, οι δυνατότητες που προκύπτουν είναι πάμπολλες και υπάρχει μεγάλη ευελιξία κινήσεων στο δημιουργικό κομμάτι των συνθέσεων, μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού.

Ο αποχωρισμός των φυτικών τμημάτων από τα δύο φυτά γινόταν με το χέρι και οι τομές των φυτών γινόταν αποκλειστικά με ανοξείδωτο μαχαίρι καθώς επίσης και με χρήση blender με ανοξείδωτες λεπίδες. Όταν οι τομές γινόταν με το blender δινόταν ιδιαίτερη προσοχή στο να μην κονιορτοποιούνται πλήρως τα φυτικά μας δείγματα και να μην γίνονται υδαρή, αλλά να κόβονται λίγο, σε μεγέθη χιλιοστών (σύντομη χρήση του μίξερ).

Το σύνολο των φυτικών ιστών από το κάθε φυτικό τμήμα, ρίπτονταν σε μεγάλες γυάλινες φιάλες των 2,5 L, σκούρου χρώματος και εν συνεχεία εισάγαμε την αιθυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ – absolute – Carlo Erba Reagenti), μέχρι να σκεπαστούν πλήρως οι φυτικοί ιστοί. Οι αναλογίες φυτικών ιστών και αιθυλικής αλκοόλης ποικίλει σε κάθε φιάλη από 1 : 1 μέχρι και 1 : 3.

Όσον αφορά τους χειρισμούς που εφαρμόστηκαν σε κάθε φυτικό τμήμα των δύο υπό εξέταση φυτών, έχουμε τα εξής:

Ο καρπός του *Viscum album* σε άλλες φιάλες τοποθετούνταν αυτούσιος και ακέραιος στην αλκοόλη και σε άλλες προτού εισαχθεί στην αλκοόλη, πολτοποιούνταν.

Τα φύλλα και οι βλαστοί του *Viscum album*, σε μερικές φιάλες κόβονταν σε πολύ μικρά κομμάτια με ανοξείδωτο μαχαίρι ή με το blender.

Τα φύλλα του *Abies alba* αρχικά αποχωρίζονταν από τους βλαστούς με το χέρι και εν συνεχεία ρίχνονταν ακέραια μέσα στη φιάλη με την αιθυλική αλκοόλη ή κόβονταν σε μικρότερα κομμάτια με τη χρήση του blender.

Ο φλοιός του *Abies alba* παραλαμβάνονταν, αφού προηγουμένως αποφλοιωνόταν οι βλαστοί του φυτού, με τη βοήθεια ανοξείδωτου μαχαιριού και εν συνεχεία τεμαχίζονταν σε μικρότερα κομμάτια, με το συγκεκριμένο μαχαίρι και τη χρήση του blender. Κατά την κοπή και την πολτοποίηση τα παρασκευάσματα ανέδιδαν μια ιδιαίτερως ευχάριστη οσμή, πράγμα που σήμαινε την παρουσία αιθέριων ελαίων και γενικότερα οσμηγόνων μορίων. Τα μόρια αυτά ήσαν προφανώς πτητικά και πρέπει να υποθέσουμε ότι ένα ικανό ποσοστό τους διέφυγε πιθανώς στην ατμόσφαιρα.

Το ξύλο του *Abies alba* παραλαμβάνονταν από τους αποφλοιωμένους βλαστούς και εν συνεχεία με τη βοήθεια του ανοξείδωτου μαχαιριού λαμβάνονταν δια κοπής, πολύ κοντές και λεπτές φλούδες από την περιοχή του ξύλου. Η συγκεκριμένη εργασία ήταν ιδιαίτερα επίπονη, δύσκολη και

χρονοβόρα, με αποτέλεσμα να χρειάζονται τρεις ημέρες για τη παρασκευή μόνο μιας φιάλης.

Τα σημεία συνέργειας των δύο φυτών τεμαχίζονταν με το ανοξειδωτο μαχαίρι και εν συνεχεία τοποθετούνταν στο blender όπου ακολουθούσε μεγαλύτερος τεμαχισμός.

Όλα τα φυτικά τμήματα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας, ενώ η αλκοόλη ογκομετρούνταν μέχρι την πλήρη κάλυψη των φυτικών ιστών στη φιάλη.

Επίσης από την ακριβή ζύγιση των επί μέρους φυτικών τμημάτων μερικών τυπικών φυτών *Viscum album*, προέκυψε ότι το βάρος των καρπών του κάθε φυτού είναι το 10 % του ολικού βάρους του φυτού, το βάρος των φύλλων του είναι το 44 % του ολικού βάρους του φυτού και το βάρος των βλαστών του είναι το 45 % του ολικού βάρους του φυτού και επομένως σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι η αναλογία μεταξύ των τριών φυτικών τμημάτων είναι 1 : 4,5 : 4,5, ενώ η αναλογία μεταξύ φύλλων και βλαστών είναι 1 : 1.

Τα αλκοολικά εκχυλίσματα διατηρήθηκαν από τη πρώτη ημέρα της παρασκευής τους στον ψυκτικό θάλαμο του εργαστηρίου (4 °C) και επί καθημερινή βάση ανακινούνταν και παρατηρούνταν για τυχόν αλλοιώσεις, για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Γενικά σύμφωνα με τα παραπάνω, η συλλογή των φυτών και η κατασκευή των αλκοολικών εκχυλισμάτων είναι ιδιαίτερα δύσκολες και χρονοβόρες εργασίες, ενώ ο τεμαχισμός των φυτών στα επί μέρους φυτικά τμήματα θα πρέπει να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, μετά από τη συλλογή τους κι ιδιαίτερα του *Viscum album*, μιας και δεν μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα και υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσής του.

Γ. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΥΛΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* & *Abies alba*.

Μετά από την πάροδο τουλάχιστον τριών μηνών, από την παρασκευή του κάθε φυτικού εκχυλίσματος, το οποίο προέκυψε από το κάθε φυτικό τμήμα έκαστου φυτού και κατόπιν της καθημερινής ανακίνησης των γυάλινων φιαλών που εμπεριέχονταν, τα φυτικά μας εκχυλίσματα ήταν έτοιμα προς χρήση.

Η απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης από τα δείγματα, αποφασίστηκε να γίνει με τη χρήση αέριου αζώτου (N) εν ψυχρώ, το οποίο διοχετεύεται μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες και με τη διαδικασία της εξάχνωσης, απομακρύνεται η ποσότητα της αιθυλικής αλκοόλης που εμπεριέχεται στα δείγματά μας.

Τα δείγματα λαμβάνονταν από τη κάθε φιάλη με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας (Gilson - 1000 μl) και πριν τοποθετηθούν στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, φιλτραριζόταν με τη βοήθεια ηθμού, ώστε να συγκρατηθούν τα τυχόν στερεά υπολείμματα του εκχυλίσματος και το δείγμα που προέκυπτε να είναι όσο το δυνατόν καθαρότερο.

Οι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν ξεπλένονταν με δις-απεσταγμένο νερό προσεκτικά και εν συνεχεία αφήνονταν να στεγνώσουν καλά εντός του απαγωγού θαλάμου. Μετά τη πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας που εμπεριέχονταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες, ζυγίζονταν κενοί με ακρίβεια, σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εν συνεχεία τοποθετούσαμε το φιλτραρισμένο αλκοολικό εκχύλισμα στο εσωτερικό τους.

Οι εργασίες λήψης των δειγμάτων γινόταν πάντοτε εντός του ψυκτικού θαλάμου και εν συνεχεία τα δείγματα τοποθετούνταν στον απαγωγό θάλαμο.

Στους πρώτους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνταν αλκοολικά δείγματα 5 ml, με το κάθε φυτικό τμήμα ξεχωριστά. Έτσι σε πρώτη φάση δημιουργήθηκαν επτά δοκιμαστικοί σωλήνες από τα δύο υπό εξέταση φυτά ως εξής: τρεις σωλήνες από το φυτό *Viscum album* (Φύλλο – Καρπός – Βλαστός), τρεις σωλήνες από το φυτό *Abies alba* (Φύλλο – Φλοιός – Ξύλο) και ένας σωλήνας με τα σημεία συνέργειας των δύο φυτών.

Ο τρόπος με τον οποίο γινόταν η διοχέτευση του αέριου αζώτου (N), βασιζόταν στον εξής μηχανισμό: η μεταλλική φιάλη με το αέριο άζωτο (N), συνδεόταν με μανόμετρο πίεσης και στρόφιγγα ελέγχου εξόδου του αερίου. Εν συνεχεία υπήρχε ο ελαστικός σωλήνας παροχής του αερίου ο οποίος συνδεόταν με μια μακριά προχοΐδα και η οποία ήταν σταθερά συνδεδεμένη σε μεταλλικές δαγκάνες. Στο κάτω άκρο της προχοΐδας συνδεόταν ένας απλός γυάλινος σωλήνας Pasteur από τον οποίο είχαμε αφαιρέσει (με θραύση) το στενό του ακροφύσιο, με σκοπό να έχουμε μεγαλύτερο έλεγχο του παροχετευόμενου αερίου και κατά συνέπεια του στροβιλισμού που

δημιουργούνται μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Όλες οι ενώσεις των σωληνώσεων απομονώθηκαν λεπτομερώς με parafilm και εν συνεχεία κολλήθηκαν σταθερά με λευκή ταινία τραυμάτων, με σκοπό τον μηδενισμό των απωλειών του αερίου αζώτου.

Το αέριο άζωτο διοχετεύονταν μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα με περίσσεια προσοχή, όπου με την στρόφιγγα αυξομείωσης της παροχής του αερίου, δημιουργούσα ελαφρύ στροβιλισμό του δείγματος ώστε να αποφευχθούν τυχόν απώλειες του. Η άκρη του γυάλινου σωλήνα pasteur εισέρχονταν μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα, αλλά ποτέ δεν βυθιζόταν εντός του δείγματος, απλά στεκόταν λίγο πάνω από την ανώτερη στάθμη του. Ο γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας με το δείγμα ήταν τοποθετημένος σε στατώ και κάθε φορά που η στάθμη του αλκοολικού μας δείγματος κατέβαινε λόγω της εξάχνωσης, κατέβαζα ταυτόχρονα και την άκρη του γυάλινου σωλήνα pasteur, ώστε να επιτυγχάνεται πάντοτε ο ίδιος στροβιλισμός μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Αυτό συνεχιζόταν μέχρι της πλήρους απομάκρυνσης της αλκοόλης από το δείγμα μας.

Εν συνεχεία ζυγίζονταν αμέσως ο γυάλινος δοκιμαστικός σωλήνας με ότι απέμεινε από το δείγμα μας, στο ζυγό ακριβείας των τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Από τη διαφορά των δύο ζυγίσεων, προέκυπτε η ποσότητα του απαλλαγμένου από την αιθυλική αλκοόλη, δείγματος. Αμέσως μετά έβαζα το δοκιμαστικό σωλήνα κάτω από τη παροχή του αζώτου, ώστε να γεμίσει με το αέριο και έκλεινα απότομα το στόμιο του σωλήνα για να μην υπάρξουν απώλειες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν αμέσως μετά στον καταψύκτη του εργαστηρίου ($- 80^{\circ} \text{C}$), στον οποίο παρέμεναν για μελλοντική χρήση.

Κάθε δείγμα φτιαχνόταν ξεχωριστά και μετά την πλήρη ολοκλήρωση των διαδικασιών και την απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης, ακολουθούσαμε την ίδια διαδικασία με το επόμενο δείγμα.

Ο χρόνος που απαιτούνταν για την απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης, μόνο από ένα δείγμα, ήταν περίπου τέσσερις ώρες, γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη εργασία, ιδιαίτερα χρονοβόρα και δύσκολη αν λάβει κανείς υπόψιν, τον μεγάλο αριθμό δειγμάτων που φτιάχτηκαν για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Ιδιαίτερα για τα in vivo πειράματα, καθημερινά έπρεπε να φτιάχνονται τόσα δείγματα, όσα ήταν απαραίτητα για

την δημιουργία τόσων εναίσιμων μορφών του εκχυλίσματος, όσα και τα ζώα που ανήκαν στα ζώα θεραπείας σε κάθε ένα από τα πέντε in vivo πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, επί τους μήνες που διαρκούσε το κάθε πείραμα. Ακόμα κι όταν επιταχύνθηκαν οι διαδικασίες κατασκευής των δειγμάτων, καθημερινά απαιτούνταν τουλάχιστον οκτώ ώρες μόνο για την κατασκευή των ημερήσιων δόσεων που απαιτούνταν, για τη χορήγησή τους στα πειραματόζωα.

Με τη πάροδο του χρόνου βελτιώθηκε το σύστημα σωληνώσεων που παροχετεύει το αέριο άζωτο στα δείγματα, με την εγκατάσταση πρωτότυπης κατασκευής, η οποία βασιζόταν στην αρχική, αλλά με την προσθήκη ενός εύχρηστου Υ (tubing connectors Y-shape) του οποίου η μία άκρη προσαρμοζόταν στην άκρη της προχοϊδας, ενώ στις υπόλοιπες δύο εξόδους τοποθετούνταν από ένας γυάλινος σωλήνας pasteur, στους οποίους αφαιρούνταν το στενό τους ακροφύσιο κατά τα γνωστά. Με αυτό τον τρόπο μειώθηκε ο χρόνος παρασκευής των δειγμάτων στο μισό.

Όταν καταλήξαμε για το ποια ήταν τα πιο δραστικά φυτικά τμήματα από τα δύο φυτά (φύλλο – φλοιός από το *Abies alba* και φύλλο – βλαστός από το *Viscum album*) και εφ' όσον μειώσαμε το χρόνο απομάκρυνσης της αιθυλικής αλκοόλης από τα δείγματά μας, αρχίσαμε να φτιάχνουμε τα περιβόητα cocktail. Το cocktail του μικτού εκχυλίσματος κατασκευαζόταν, λαμβάνοντας 3 ml από κάθε εκχύλισμα, κάθε φυτικού τμήματος από τα τέσσερα δραστικότερα, των δύο υπό εξέταση φυτών. Έτσι δημιουργούταν δείγματα συνολικού όγκου 12 ml. Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα δημιουργήθηκαν δείγματα μεγαλύτερου όγκου των 20 ml (5 ml από το κάθε δραστικό φυτικό κλάσμα).

Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα τμήματα της πρωτότυπης κατασκευής των σωληνώσεων παροχής αέριου αζώτου, αντικαθιστούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με καινούργια.

Παρόλο όμως που αναφέρθηκε ότι πρόκειται για μια δύσκολη και χρονοβόρα εργασία, από την άλλη πλευρά είναι ιδιαίτερα ευχάριστη λόγω των πλούσιων αρωμάτων που διαχέονται στο χώρο, από τα αιθέρια έλαια που εμπεριέχονται στα δείγματά μας.

Δ. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* και *Abies alba* – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΟΓΚΟ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΝΤΟΣ ΔΙΑ 3,4 – ΒΕΝΖΟΠΥΡΕΝΙΟΥ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Δ(1). ΜΟΝΤΕΛΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ.

Για την μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε ένα γνωστό και δοκιμασμένο μοντέλο χημικής καρκινογένεσης, το οποίο αναπτύχθηκε και τελειοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μεταξύ του 1976 και 1984. Το μοντέλο αυτό επινοήθηκε για την κάλυψη συγκεκριμένων αναγκών της μελέτης των καρκινογόνων δράσεων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, με αντιπροσωπευτικότερη ουσία το 3,4–βενζοπυρένιο ή συντομογραφικώς B[a]P. Τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του εν λόγω μοντέλου είναι τα ακόλουθα:

1^ο) Η χρήση μιας μόνο δόσης καρκινογόνου το οποίο ενίεται εφ' άπαξ και υποδορίως στο πειραματόζωο, όπως επίσης η σταθερότητα και μη τοξικότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη (10,08 mg B[a]P σε 1 ml τρικαπρυλίνης ανά πειραματόζωο).

2^ο) Το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιείται ένα δεύτερο χημικό σώμα για την πραγματοποίηση της καρκινογένεσης, δηλαδή δεν χρησιμοποιείται μετά την χορήγηση του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα κάποιος εστέρας της μυριστικής φορβόλης, ή καθαρό έλαιο κρότωνα.

3^ο) Η σταθερότητα των χρόνων εμφάνισης και ανάπτυξης των όγκων.

4^ο) Η σταθερότητα των χρονικών διαστημάτων που μεσολαβούν από την ημερομηνία έγχυσης του καρκινογόνου, μέχρι την ημερομηνία θανάτου των πειραματόζωων. Ως βασικό πειραματόζωο επιλέγεται ο επίμυς Wistar.

5^{ον}) Η εμφάνιση ενός μονήρους όγκου και μόνον στο σημείο του σώματος όπου έγινε η έγχυση του B[a]P, ο οποίος είναι πάντοτε ένα σάρκωμα του συνδετικού ιστού ή των μυϊκών ιστών. Ο συχνότερα εμφανιζόμενος όγκος είναι ιστολογικά το λειομυοσάρκωμα.

6^{ον}) Η πολύ υψηλή απόδοση της χημικής καρκινογένεσης: Σχεδόν το 100% της ομάδας των πειραματόζων αναπτύσσουν νεόπλασμα εντός 100 ημερών από την έγχυση του B[a]P και πεθαίνουν σε χρονικό διάστημα έως 160 ημερών. Η αποτυχία της καρκινογένεσης είναι μικρότερη του 3%.

7^{ον}) Η σταθερότητα του χρονικού διαστήματος δημιουργίας του μονήρους νεοπλασματος, η σταθερότητα του προσδόκιμου επιβίωσης των καρκινοπαθών πειραματόζων, η υψηλότερη απόδοση της χημικής καρκινογένεσης, αλλά και η σχετική σταθερότητα παραγωγής σαρκωματικών όγκων, κατά προεξάρχοντα τρόπο, είναι θεμελιακά χαρακτηριστικά που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την ποσοτική και μαθηματική εκτίμηση της δράσης ενός παράγοντα ικανού, είτε να αναστείλει (ή να τροποποιήσει) την χημική καρκινογένεση (αντικαρκινογόνο), είτε να αναστείλει (ή να τροποποιήσει) την ανάπτυξη των κακοηθών όγκων.

8^{ον}) Η μαθηματική φόρμουλα που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αναστολής – τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης είναι η ακόλουθη:

Καρκινογόνος Ισχύς B[a]P = [(ποσοστό των πειραματόζων που εμφάνισαν όγκο στην ομάδα ελέγχου) / (Μέσος όρος ημερών επιβίωσης των πειραματόζων)] X 100.

Η χορήγηση ενός κατάλληλου χημικού παράγοντα μαζί με το B[a]P είναι δυνατόν να μειώσει την ένταση της καρκινογόνου ισχύος αυτού, οδηγώντας σε μια εξουδετέρωση της δράσης του. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν αυτός ο χορηγούμενος παράγοντας είναι σε θέση να παρέμβει στον συνολικό μηχανισμό δράσης του συγκεκριμένου καρκινογόνου, αναστέλλοντας, ή επιβραδύνοντας κάποια βήματα του.

α) Προπαρασκευή του καρκινογόνου.

Για την πραγματοποίηση της χημικής καρκινογένεσης χρησιμοποιούταν καθαρό 3,4-βενζοπυρένιο (B[a]P), το οποίο ζυγιζόταν σε αναλυτικό ζυγό σε ποσότητα τέτοια ώστε κάθε πειραματόζωο να λάβει 10,08 mg της ουσίας, εφ'άπαξ, διαλυμένης σε 1 ml τρικαπριλίνης.

Η ζύγιση του 3,4-βενζοπυρενίου (B[a]P) , όπως και η διάλυσή του στην τρικαπριλίνη, γινόταν μέσα σε απαγωγό λαμβάνοντας όλες τις απαραίτητες προφυλάξεις που προϋποθέτει ο χειρισμός αυτής της επικίνδυνης καρκινογόνου ουσίας.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιούταν σκεύη μιας χρήσης, ενώ όλη η επιφάνεια του ζυγού, όπως επίσης και η επιφάνεια της απαγωγού εστίας καλυπτόταν επιμελώς με λεπτά φύλλα αλουμινίου.

Οι χρήστες (δύο άτομα) χρησιμοποιούσαν ενδύματα χημικού κινδύνου και αναπνευστικές μάσκες πλήρους προσώπου με φίλτρα κατακράτησης εξειδικευμένα για οργανικές ουσίες (Full Face Chemical Risk Mask). Η διάλυση του B[a]P γινόταν εντός πλαστικής στεγανής κωνικής φιάλης με την βοήθεια σταθερής μαγνητικής ανάδευσης καθ' όλη την νύχτα (over night).

Ο χώρος της ζύγισης και της διάλυσης ελεγχόταν επιμελώς με λυχνίες UV για την διαπίστωση τυχούσας διαφυγής B[a]P, καθόσον το τελευταίο φθορίζει ισχυρά, ενώ τα φύλλα κάλυψης μετά την ζύγιση και άλλους χειρισμούς, απομακρυνόταν προσεκτικά και τοποθετούνταν σε πλαστική αεροστεγή σακούλα για περαιτέρω διαχείριση από την αρμόδια υπηρεσία του Τμήματος Χημείας.

Επίσης το δοχείο διάλυσης του καρκινογόνου, όπως και οι σύριγγες έγχυσης συλλεγόταν και τοποθετούνταν εντός στεγανού δοχείου και παραδινόταν στην ίδια υπηρεσία,.

Η ενδυμασία προφύλαξης που χρησιμοποιήθηκε για την ζύγιση και την διάλυση χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την έγχυση της ουσίας στους επίμυες Wistar. Το B[a]P ελήφθη από την εταιρεία Fluka ενώ η τρικαπριλίνη ήταν της εταιρείας Sigma – Aldrich.

I) Χορήγηση του καρκινογόνου στους επίμους Wistar

α) Ομάδα ελέγχου

Η χημική καρκινογένεση πραγματοποιείτο σε έναν κατάλληλο αριθμό επίμους Wistar ηλικίας 60 ημερών και βάρους από 90-130 g. Τα ζώα ήσαν ή θήλεα ή αρρένα. Αν χρησιμοποιούταν και θήλεα και αρρένα, τότε ήσαν πάντοτε ισάριθμα για τον υπολογισμό των διαφορών στην καρκινογένεση λόγω φύλλου, επειδή υπάρχει διαφορά μεταξύ θηλέων και αρρένων. Τα ζώα που λάμβαναν μόνον το διάλυμα του βενζοπυρενίου αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου (Control).

Τα ζώα αναισθητοποιούταν σε κώδωνα αναισθησίας με διαιθυλικό αιθέρα και κατόπιν γινόταν σε κάθε ένα εξ αυτών μια υποδόρια έγχυση ποσότητας 10,08 mg B[a]P διαλυμένης σε 1 ml τρικαπριλίνης [Βιβλιογραφία]. Η έγχυση του B[a]P γινόταν πάντα στο δεξιό τμήμα της άνω ράχης στην περιοχή μεταξύ ωμοπλάτης και σπονδυλικής στήλης.

Η επιλογή σταθερού σημείου έγχυσης του B[a]P γινόταν ώστε τα μεθιστάμενα κύτταρα του αναπτυσσόμενου όγκου να αντιμετωπίζουν τις ίδιες περίπου δυσκολίες όσον αφορά τις επιφάνειες διήθησης (επέκταση νεοπλάσματος κατά συνέχεια ιστού) και τις αγγειακές διαδρομές (αιματογενής διασπορά) προς τον πνεύμονα..

Όλα τα ζώα τοποθετούταν σε κλωβούς, ανά δύο ή τρία άτομα, στο εσωτερικό του εκτροφείου πειραματόζων σταθερών συνθηκών (θερμοκρασία 20°C, φωτοπερίοδος 12 ωρών συσκότισης και 12 ωρών φωτισμού, φωτισμός με λυχνίες Ne, υγρασία 70 %) και παρακολουθούταν δύο φορές την ημέρα. Η αλλαγή της στρωμνής των πειραματόζων γινόταν μια φορά την εβδομάδα.

Τα ζώα διατρέφονταν με φύραμα εξειδικευμένο για την τακτική εκτροφή επίμους Wistar και υδροδοτούνταν από τον αγωγό ύδρευσης. Η πρόσβαση των ζώων στην τροφή και στο νερό ήταν ελεύθερη και διαρκής (ad libitum).

Όλα τα ζώα και των δύο ομάδων τα οποία κατέληγαν, υποβαλλόταν σε νεκροτομή – νεκροψία, ενώ όλα τα σπλάχνα του σώματος ζυγίζονταν, μονιμοποιούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 8 % και κατόπιν διενεργούνταν

επί των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων τους, ιστοπαθολογικός έλεγχος με κατάλληλες χρώσεις.

Η συχνότητα των μεταστάσεων εκτιμήθηκε αντιπροσωπευτικά μέσω της μέτρησης των μεταστατικών εστιών στο επίπεδο του δεξιού πνεύμονα επί δύο τομών (οβελιαία και εγκάρσια).

II) Πειράματα αναστολής χημικής καρκινογένεσης με μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών (*Viscum album* και *Abies alba*).

Μια κατάλληλα επιλεγμένη ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος (ξήρανση σε ρεύμα αζώτου), διαλυόταν σε τρικαπριλίνη στην οποία είχαμε ήδη διαλύσει μια συγκεκριμένη ποσότητα B[a]P. Ο λόγος διάλυσης του B[a]P προς την τρικαπριλίνη ήταν 10,08 mg: 1 ml. Η ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος που χρησιμοποιούταν ήταν 3,75 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα B[a]P σε mg, καθόσον δεν υπήρχε δυνατότητα χρήσης του γραμμομορίου, ως μονάδα μάζας.

Το συνολικό διάλυμα εκχυλίσματος – B[a]P - τρικαπριλίνης παρέμεινε σε αεροστεγές πλαστικό δοχείο υπό διαρκή ανάδευση μέσω μαγνητικού αναδευτήρα επί 24ωρο και κατόπιν ελεγχόταν για τον φθορισμό του σε λυχνία ακτινών UV.

Εν συνεχεία το μικτό αυτό διάλυμα ενιόταν υποδορίως σε κατάλληλο αριθμό επίμυων Wistar ηλικίας 60 ημερών και βάρους από 100 έως 120 γραμμάρια, ακολουθώντας πανομοιότυπα το πρωτόκολλο που περιγράψαμε ανωτέρω για τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Όλα τα εν λόγω ζώα, όπως ακριβώς και εκείνα της ομάδας ελέγχου, αμέσως μετά τον θάνατό τους νεκροτομούνταν και οι όγκοι τους ελεγχόταν ιστοπαθολογικά, ενώ επίσης μετρούνταν οι μεταστάσεις τους στον πνεύμονα όπως περιγράψαμε παραπάνω.

Δ(2). ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΜΕΣΩ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΝΤΑ ΟΓΚΟ ΜΕ Β[α]Ρ ΣΕ ΕΠΙΜΥ W1STAR.

Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμυος Wistar που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* και *in vivo* μελέτη των δράσεων του μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, παρήχθησαν ως εξής:

Από μία ομάδα συγγενών πειραματόζων η οποία ανήκει στην 7^η γενεά ομομικτικής αναπαραγωγής ελήφθησαν 3 αρσενικά και 3 θηλυκά ζώα στα οποία χορηγήθηκε κατόπιν αναισθητοποίησης ποσότητα Β[α]Ρ με την ίδια τεχνική που περιγράφηκε παραπάνω. Μετά την παρέλευση 110 - 135 ημερών όλα τα ζώα ανέπτυξαν όγκους, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους χαρακτηρίστηκαν ιστολογικά ως λειομυοσαρκώματα (4 / 6), ενώ σε ένα από τα πειραματόζωα αναπτύχθηκε ινοσάρκωμα πτωχό σε κύτταρα και στο τελευταίο ένα ραβδομυοσάρκωμα.

Οι βιοψίες σε όλα τα ζώα έγιναν κατόπιν αναισθητοποίησης με διαιθυλικό αιθέρα και τα κακοήγη κύτταρα ελήφθησαν με βιοπτική βελόνα.

Από τους όγκους των ζώων που είχαν χαρακτηριστεί ως λειομυοσαρκώματα ελήφθησαν (κάτω από άσηπτες συνθήκες και κατόπιν αναισθητοποίησης με κεταμίνη – μιδαζολάμη) τεμάχια μεγέθους 0,5 cm² τα οποία ετέθησαν αμέσως σε ψυχρό διάλυμα Ringer. Κατόπιν τα ιστοτεμάχια καταμήθηκαν περαιτέρω ώστε να προκύψουν τεμαχίδια μεγέθους περίπου 1 mm² τα οποία ελήφθησαν άσηπτα από το Ringer και τοποθετήθηκαν σε 20 ml διαλύματος θρυψίνης 0,25 %.

Η επώαση των τεμαχίων γινόταν με ήπια ανάδευση και ανά 15 min λαμβανόταν το υπερκείμενο το οποίο τοποθετούνταν σε άσηπτους πλαστικούς σωλήνες (falcon) για περαιτέρω επεξεργασία (φυγοκέντρηση – τέλος 1^{ου} κύκλου θρυψινισμού). Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέταμε 1 ml Fetal Bovine Serum (FBS) για να σταματήσουμε τη δράση της θρυψίνης και κατόπιν ξεκινούσαμε τη φυγοκέντρηση.

Το ίδιο χρονικό διάστημα πριν περάσουμε στο 2^ο κύκλο θρυψινισμού προκειμένου τα τεμαχίδια του όγκου να παραμείνουν βιώσιμα προσθέταμε 10 ml DMEM (Dulbecco's MEM) ώστε η δράση της θρυψίνης να ανασταλεί. Ταυτόχρονα οι προηγούμενοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν το

εναιώρημα των καρκινικών κυττάρων τα οποία αποκολλήθηκαν από τον όγκο δια θρυψινισμού, φυγοκεντρούνταν στις 1200 rpm για 5 min ώστε τα αιωρούμενα καρκινικά κύτταρα να καταπέσουν στον πυθμένα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απορρίπταμε το υπερκείμενο, προσθέταμε 10 ml PBS επανααιωρούσαμε τα κύτταρα με ήπιες αναρροφητικές κινήσεις της πιπέτας και τα επαναφυγοκεντρούσαμε στις ίδιες συνθήκες. Απορρίπταμε ξανά το υπερκείμενο, προσθέταμε 10 ml DMEM με 10% FBS και κατόπιν πραγματοποιούσαμε σπορά του νέου εναιωρήματος ώστε 1 ml αυτού να τίθεται σε τρυβλίο Petri με 9 ml DMEM με 10% FBS (τελικός όγκος καλλιέργειας 10 ml).

Τα κύτταρα διατηρούταν σε επωαστήρα (37°C, 95 % O₂, 5 % CO₂) και ελέγχονταν οπτικά μία φορά την ημέρα. Όταν δημιουργούσαν πλήρες ταπήτιο γινόταν έκπλυση με 10 ml PBS, αποκόλληση των κυττάρων με 1 ml διαλύματος θρυψίνης και αναδιασπορά σε καινούργια τρυβλία ώστε να έχουμε μεγάλους αριθμούς νεοπλασματικών κυττάρων.

Τα κύτταρα αυτά λαμβάνονταν από τα τρυβλία φυγοκεντρούνταν, τοποθετούνταν σε διάλυμα FBS και DMSO (αναλογία 9:1) και κατόπιν φυλάσσονταν εντός κρυσταλλοθηκών σε υγρό άζωτο για την επαναχρησιμοποίησή τους.

Ο έλεγχος της φύσης των εν λόγω κυττάρων έγινε με δύο τρόπους:

- Με τυπικό μικροσκοπικό έλεγχο
- Με βιολογική δοκιμασία

Η βιολογική δοκιμασία της νεοπλασματικής φύσης των εν λόγω κυττάρων γινόταν ως εξής: Από πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες των οποίων τα κύτταρα ήταν σε μεγάλο ποσοστό βιώσιμα γινόταν λήψη μεγάλων αριθμών κυττάρων τα οποία ενοφθαλμιζονταν σε επίμυες Wistar που ανήκαν στην ομοικτική σειρά ζώων από τους οποίους είχε γίνει η λήψη του αρχικού όγκου.

Πριν τον ενοφθαλμισμό κάθε ένα από τα ζώα – λήπτες αναισθητοποιούνταν με κεταμίνη – μιδαζολάμη και υποβαλλόταν σε χειρουργική τομή κατά πρώτο σκοπό.

Το μήκος της τομής ήταν περίπου 2 cm. Οι υποδόριοι ιστοί παρεκτοπίζονταν μέσω απώθησης με λαβίδα και κατόπιν η αποκαλυφθείσα

μυϊκή στοιβάδα τραυματιζόταν με ήπιους νυγμούς ώστε να προκαλείται μικρή τοπική αιμορραγία.

Επί της δημιουργηθείσας μικρής πληγής γινόταν εναπόθεση των καρκινικών κυττάρων ($4 - 8 \times 10^6$ κύτταρα / ml διαλύματος Hank).

Αποφεύγαμε να χρησιμοποιήσουμε DMEM διότι σε ορισμένα πειράματα δεν είχαμε επιτυχή ενοφθαλμισμό των κυττάρων.

Μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων γινόταν σφικτή συρραφή της τομής.

Τόσο η διάνοιξη της τομής, όσο και η σύγκλισή της γινόταν υπό άσηπτες συνθήκες.

Όταν είχαμε επιτυχή ενοφθαλμισμό των καρκινικών κυττάρων ακολουθούσε ταχεία ανάπτυξη όγκου στην περιοχή του ενοφθαλμισμού (10 – 20 ημέρες). Από τους αναπτυχθέντες όγκους γινόταν κατόπιν αναισθητοποίησης λήψη δείγματος με βιοπτική βελόνη και ιστοπαθολογικός έλεγχος των κυττάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της βιοψίας ήταν θετικό για λειομυοσάρκωμα. Επίσης τα επιτυχώς ενοφθαλμισμένα με καρκινικά κύτταρα ζώα ανέπτυξαν όλα τα χαρακτηριστικά της νεοπλασματικής νόσου τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο (τοπική αύξηση όγκου, νεοαγγειογέννεση, διήθηση παρακείμενων ιστών, αιματογενή διασπορά, διήθηση λεμφαδένων, απομακρυσμένη μετάσταση, απίσχνανση, αναιμία, θάνατος).

Οι όγκοι κατά τη στιγμή του θανάτου είχαν μέγεθος που προσέγγιζε από 38 – 45 % της συνολικής μάζας του σώματος. Από επανειλημμένες δοκιμές επιλέχθηκε ένας τύπος κυττάρων και συγκεκριμένα εκείνος ο οποίος παρήγαγε την μεγαλύτερη ανάπτυξη όγκου στον ίδιο χρόνο. Ο κυτταρικός αυτός τύπος χρησιμοποιήθηκε στα περαιτέρω πειράματα της διατριβής μας, τόσο για τα *in vitro*, όσο και για τα *in vivo* πειράματα με ενοφθαλμισμούς καρκινικών κυττάρων, ώστε να υπάρχει μια ομοιογένεια στο υπό χρήση νεοπλασματικό υλικό.

Ε. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΝΕΡΓΟΥΝΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* και *Abies alba*.

Ε(1). *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΠΙ ΤΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ W1STAR – ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν τα καρκινικά κύτταρα LMS, τα οποία ελήφθησαν από το κατεψυγμένο σε υγρό άζωτο απόθεμα, της δημιουργηθείσας καρκινικής σειράς, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Μετά την απόψυξη και ανακαλλιέργεια των κυττάρων, ώστε να έρθουν σε πλήρη πολλαπλασιαστική ικανότητα, γινόταν μέτρηση αυτών για τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού τους ανά τρυβλίο (των 10 ml). Η μέτρηση αυτή πραγματοποιούνταν στο κυτταρόμετρο Newbauer με απλή μικροσκοπία και κατόπιν γινόταν σπορά 150.000 κυττάρων LMS σε κάθε φρεάτιο ενός πολυτρυβλίου 6 θέσεων, λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο συνολικός όγκος του καλλιεργητικού υγρού θα ήταν ίσος προς 3000 μl / φρεάτιο (3 ml).

Μετά την πάροδο 24 ωρών επώασης, γινόταν αναρρόφηση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού, έκπλυση με 3 ml PBS / φρεάτιο και κατόπιν προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας DMEM και συμπλήρωση του υπολοίπου (τελικός όγκος 3 ml) με το διάλυμα που περιείχε το ανασυσταθέν δια του διαλύματος Hank, ξηρανθέν αιθανολικό εκχύλισμα, ώστε αυτό να ευρίσκεται στην επιθυμητή ποσότητα (δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τον όρο συγκέντρωση διότι δεν πρόκειται περί χημικώς καθαρής ουσίας).

Τα φρεάτια αυτά ονομάζονται *Φρεάτια Δοκιμής Εκχυλίσματος*. Αντίστοιχα υπήρχαν τα *Φρεάτια Ελέγχου* σε καθένα από τα οποία γινόταν επίσης σπορά 150.000 κυττάρων LMS, προσθήκη DMEM με 10% Εμβρυϊκό Βόειο Ορό (FBS) και συμπλήρωση του υπολοίπου (τελικός όγκος 3 ml) με την ίδια ποσότητα διαλύτη που είχε χρησιμοποιηθεί στο αντίστοιχο *Φρεάτιο Δοκιμής Εκχυλίσματος*, χωρίς την ουσία. Με αυτόν τον τρόπο είχαμε ισότιμη συγκέντρωση διαλύτη στα Φρεάτια Ελέγχου και στα αντίστοιχα Φρεάτια Δοκιμής Εκχυλίσματος.

Ο χρησιμοποιηθείς διαλύτης στα αρχικά πειράματα ήταν το DMSO, το οποίο εν συνεχεία αντικαταστήσαμε από το διάλυμα Hank (NaHCO_3). Κατόπιν έγινε ξανά αντικατάσταση του διαλύματος Hank από φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl), έτσι ώστε ο μεγαλύτερος αριθμός των πειραμάτων συντελέστηκαν με διαλύτη του ξηρανθέντος εκχυλίσματος τον φυσιολογικό ορό.

Τα πολυτρυβλία επωάζονταν σε επωαστή σταθερών συνθηκών (37°C , 95 % O_2 , 5 % CO_2) και γινόταν μέτρηση των ζωντανών κυττάρων στις 24 και 48 ώρες σε όλα τα φρεάτια μετά τη χορήγηση της ουσίας.

Η δοκιμή αυτή γινόταν με τη μέθοδο αποκλεισμού των νεκρών κυττάρων δια της χρώσης Trypan Blue 0,4%. Το διάλυμα του Trypan Blue 0,4% γινόταν με προσθήκη 400 mg χρωστικής σε 100 ml PBS.

Η χρώση των κυττάρων στις αντίστοιχες ώρες μέτρησης γινόταν ως εξής: Απορρίπταμε το θρεπτικό καλλιεργητικό υγρό (DMEM), κάναμε έκπλυση με 1 ml PBS και στη συνέχεια προσθέταμε 0,25 ml διαλύματος θρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονταν για 2 min ώστε να αποκολληθούν από τον πυθμένα και να βρεθούν σε εναιώρηση. Στη συνέχεια προσθέταμε 0,25 ml PBS για την αναστολή της δράσης της θρυψίνης και 0,5 ml Trypan Blue 0,4%. Γινόταν επώαση διάρκειας 5 min και κατόπιν λαμβάναμε ποσότητα 11 μl εναιωρήματος το οποίο τοποθετούνταν στις κατάλληλες εγκοπές του κυτταρόμετρου Newbauer προς μέτρηση. Μετρούσαμε μόνο τα κύτταρα τα οποία ήταν αρνητικά στη χρώση (βιώσιμα κύτταρα).

Το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων στα Φρεάτια Δοκιμής Ουσίας εκφραζόταν σε εκατοστιαίες μονάδες συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων των Φρεατίων Ελέγχου. Οι ποσότητες (δόσεις) του εκχυλίσματος που ελέχθησαν ήταν οι εξής: 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg και 10 mg. Τα πειράματα ελέγχου βιωσιμότητας των κυττάρων LMS επαναλήφθηκαν το ελάχιστο έξι φορές, για κάθε ποσότητα εκχυλίσματος από τις προαναφερθείσες.

Μέσω των πειραμάτων αυτών προσδιορίστηκε η ποσότητα του εκχυλίσματος στην οποία είχαμε 50% θάνατο των κυττάρων (IC_{50} – Inhibitory concentration 50 %), όπως επίσης και η ελάχιστη ποσότητα αυτού η οποία προκαλούσε πλήρη θάνατο (100 %) στα κύτταρα (MLC – Minimal Lethal

Concentration). Οι δύο αυτές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν κατόπιν για τον προσδιορισμό της δοσολογίας του εκχυλίσματος στα *in vivo* πειράματα.

Με τον ίδιο τρόπο ελέγχθηκαν οι δράσεις όλων των επί μέρους εκχυλισμάτων που δημιουργήσαμε από τα δύο φυτά (για το *Abies alba* εκχυλίσματα φύλλων, φλοιού και ξύλου, για το δε *Viscum album* εκχυλίσματα φύλλων, πράσινων βλαστών, καρπών, συνέργιας των δύο φυτών). Από την πορεία όλων των ανωτέρω πειραμάτων, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα πιο δραστικά εκχυλίσματα των προαναφερθέντων ιστών των υπό μελέτη φυτών, ήσαν για το μεν *Viscum album* τα φύλλα και ο βλαστός, για το δε *Abies alba* τα φύλλα και ο φλοιός.

Εν συνεχεία μελετήσαμε σε βάθος το εξής cocktails από τα φυτικά αυτά εκχυλίσματα, δηλαδή: *Viscum album* (φύλλα – βλαστοί) + *Abies alba* (φύλλα – φλοιοί).

Ε(2). ΠΕΙΡΑΜΑ *In Vivo* ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ ΕΠΩΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΚΑΙ ΕΓΧΥΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ W1STAR.

Φωτογραφίες 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 (Παράρτημα Ι – Σελ. 358 – 361).

Για την πραγματοποίηση του εν λόγω πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 32 επίμυες Wistar, άρρηνες και θήλεια (16 και 16 αντιστοίχως). Τα ζώα κατανεμήθηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες των 16 ατόμων, την Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.) και την Ομάδα Εξουδετέρωσης (Ο.ΕΞ.). Τα ζώα τοποθετήθηκαν ανά δύο σε κλωβούς από Plexiglas, εφοδιασμένους με ατσάλινο κάλυμμα οροφής και παρακολουθούνταν δύο φορές την ημέρα (πρωί – απόγευμα) ανά 12 ώρες.

Εκ παραλλήλου ζυγίσαμε με ξεχωριστούς χειρισμούς δύο φορές από 160 mg 3,4 – βενζοπυρενίου (Fluka) και τοποθετήσαμε τις εν λόγω ποσότητες σε δύο διαφορετικές κωνικές φιάλες χωρητικότητας 200 ml η κάθε μια. Στην πρώτη κωνική φιάλη προσθέσαμε 150 ml τρικαπρυλίνης (Aldrich) και μικρό πλαστικοποιημένο μαγνήτη, ώστε να είμαστε σε θέση να πραγματοποιήσουμε πλήρη διάλυση των 160 mg του 3,4 – βενζοπυρενίου, δια ανάδευσης, μέσω περιστροφής του μαγνήτη. Στην δεύτερη κωνική φιάλη, εκτός των 160 mg του

βενζοπυρενίου, και τα 160 ml της τρικαπρυλίνης, προσθέσαμε 600 mg αφυδατωμένου (στερεού) εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba*. Και στην εν λόγω κωνική φιάλη προστέθηκε ένας πλαστικοποιημένος μαγνήτης και άρχισε η προσπάθεια διάλυσης του συνόλου (βενζοπυρενίο + στερεοποιημένο εκχύλισμα των δύο φυτών) με την χρήση περιστροφικού αναδευτήρα, όπως και προηγουμένως.

Η ανάδευση των περιεχομένων των δύο φιαλών διήρκησε 24 ώρες σε συνθήκες δωματίου, και σε απαγωγό εστία. Οι δύο φιάλες είχαν πωματιστεί αεροστεγώς καθ' όλη την διάρκεια της 24ωρης ανάδευσης. Το βενζοπυρενίο διαλύθηκε υπό αυτές τις συνθήκες σε μισή περίπου ώρα, ενώ η πρόσμιξη του βενζοπυρενίου και του ξηρού εκχυλίσματος χρειάστηκε για να διαλυθεί πλήρως περί την μια και μισή ώρα. Συνεπώς ο υπόλοιπος χρόνος ανάδευσης – επώασης μπορεί να θεωρηθεί και ως χρόνος χημικής αντίδρασης του βενζοπυρενίου με τον διαλύτη και το εκχύλισμα των φυτών.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών σταμάτησε η ανάδευση του περιεχομένου των φιαλιδίων και τα διαλύματα τοποθετήθηκαν μέσα σε σύριγγες των 10 ml η κάθε μία. Οι βελόνες των συριγγών ήσαν 22 G και προκειμένου να σταθεροποιηθούν επί της σύριγγας τυλίχθηκαν με παραφίλμ. Κατά τον τρόπο αυτόν ήταν δυνατόν να αποφευχθεί η εκτίναξη της βελόνης και ο διασκορπισμός του βενζοπυρενίου στην ατμόσφαιρα του χειρουργείου, όπου θα μπορούσε να μολύνει σοβαρά το παριστάμενο προσωπικό. Η εκτίναξη της βελόνας της σύριγγας είχε στο παρελθόν λάβει χώρα εξ αιτίας των υψηλών πιέσεων που ασκούσε ο πειραματιστής επί του εμβόλου της σύριγγας για την υπερνίκηση του πολύ μεγάλου ιξώδους του διαλύματος.

Κατόπιν τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν ένα προς ένα διαδοχικά με διαιθυλικό αιθέρα σε κώδωνα αναισθητοποίησης. Κατά την διάρκεια της αναισθητοποίησης σε κάθε ζώο της Ομάδας Ελέγχου ενέσαμε ποσότητα 1 ml διαλύματος βενζοπυρενίου και τρικαπρυλίνης υποδορίως στην περιοχή της δεξιάς ωμοπλάτης. Αντιστοίχως σε κάθε πειραματόζωο της Ομάδας Εξουδετέρωσης ενέσαμε επίσης 1 ml διαλύματος βενζοπυρενίου, τρικαπρυλίνης και φυτικού εκχυλίσματος (που είχε παρασκευαστεί όπως περιγράφεται ανωτέρω).

Τα ζώα μετά την ανάνηψη τους επανατοποθετήθηκαν στους κλωβούς τους και παρακολουθούνταν σταθερά δύο φορές την ημέρα ανά 12 ώρες

(πρωί – βράδυ), διαμένοντα σε εκτροφείο σταθερών συνθηκών (22 ° C, 12ωρη περίοδος φωτισμού – 12ωρη περίοδος συσκότισης, σταθερή υγιεινή).

Τα ζώα ζυγίζόταν μια φορά την εβδομάδα και γινόταν επιμελής ψηλάφησή τους ανά τρεις ημέρες προκειμένου να διαπιστωθεί η ανάπτυξη τυχόντος όγκου. Όταν η παρουσία του όγκου γινόταν αντιληπτή, φυσικά σε μακροσκοπικό επίπεδο, η ψηλάφηση συνεχιζόταν κάθε δεύτερη ημέρα, όπως επίσης και η μέτρηση της μεταβολής των διαστάσεων του μορφώματος με την χρήση παχυμετρικού διαβήτη.

Μετά την παρέλευση εκατό ημερών από την έγχυση του διαλύματος βενζοπυρενίου και βενζοπυρενίου – εκχυλίσματος, τα ζώα θυσιάστηκαν με την χορήγηση μικρής ποσότητας κεταμίνης – μιδαζολάμης και ξυλοκαΐνης.

Εν συνεχεία νεκροτομήθηκαν, έγινε απομόνωση, ζύγιση, καταμέτρηση του μεγέθους των όγκων με την μέθοδο του εκτοπισμού ύδατος σε βαθμονομημένο κύλινδρο, τομή και μακροσκοπική παρατήρηση. Κατόπιν έγινε μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 8% του όγκου και των σπλάχνων, του κάθε πειραματόζωου και μερικές ημέρες μετά έγινε προπαρασκευή αυτών για μικροσκοπική εξέταση, προκειμένου να ελεγχθεί ιστολογικά ο τύπος των όγκων, όπως επίσης και οι τυχούσες μεταστάσεις αυτών στον πνεύμονα, στο ήπαρ και σε άλλα εσωτερικά όργανα.

Από την Ομάδα Ελέγχου δεν ελήφθησαν υπ' όψιν δύο πειραματόζωα που πέθαναν κατά την διάρκεια της αναισθησίας, όπως επίσης και δύο από την Ομάδα Εξουδετέρωσης, τα οποία πέθαναν δύο μέρες μετά την αναισθησία και την χορήγηση του cocktail βενζοπυρενίου – τρικαπρυλίνης – εκχυλίσματος.

Ε(3). ΜΕΛΕΤΗ *IN VIVO* ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ ΠΟΥ ΕΓΙΝΑΝ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΕΙΣ ΜΕΣΩ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

Φωτογραφίες 9 – 10 – 11 – 12 – 13 – 14 – 15 – 16 – 17 – 18 – 19 – 20 – 21
(Παράρτημα Ι – Σελ. 362 – 366).

Για την εκτέλεση του εν λόγω πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 60 πειραματόζωα και των δύο φύλλων (σε ίσους μεταξύ τους αριθμούς), ηλικίας 90 ημερών και βάρους κυμαινόμενου μεταξύ 127 έως 165 γραμμαρίων. Το 50% του συνόλου των ζώων ήταν θηλυκά και το 50% ήσαν αρσενικά.

Τα ζώα μοιράστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες περιλαμβάνουσες 30 ζώα η κάθε μία (15 θηλυκά και 15 αρσενικά). Η πρώτη ομάδα ήταν η Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.) και η δεύτερη ήταν η Ομάδα Θεραπείας (Ο.Θ.). Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση κεταμίνης και μιδαζολάμης στην δόση 10 mg για την κεταμίνη και 5 mg για την μιδαζολάμη, ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος.

Τα ζώα προέρχονταν από κοινούς προγόνους και είχαν προκύψει από ομοικτικές αναπαραγωγές επί επτά γενεές, οπότε η γενετική τους σύσταση παρουσίαζε πολύ υψηλή ομοιομορφία.

Αμέσως μετά την επίτευξη της αναισθησίας σε κάθε ζώο πραγματοποιούνταν χειρουργική τομή κατά πρώτο σκοπό ολικού πάχους του δέρματος, επί της περιοχής μεταξύ της δεξιάς ωμοπλάτης και της σπονδυλικής στήλης. Το μήκος της τομής ήταν το μέγιστο 2 εκατοστά.

Οι υποδόριοι συνδετικοί ιστοί παρεκτοπίζονταν μέσω αναίμακτης διάνοιξης και απώθησης με λαβίδα και κατόπιν η αποκαλυφθείσα μυϊκή στοιβάδα τραυματιζόταν με ήπιους νυγμούς ώστε να προκαλείται μικρή τοπική αιμορραγία. Επί της δημιουργηθείσας μικρής πληγής γινόταν εναπόθεση των καρκινικών κυττάρων ($1,5 \times 10^6$ κύτταρα / ml διαλύματος Hank) με την χρήση πλαστικής αποστειρωμένης σύριγγας. Αποφεύγαμε να χρησιμοποιήσουμε DMEM, ως μέσο διασποράς των ενοφθαλμιζόμενων κυττάρων, διότι σε ορισμένα πειράματα με την χρήση αυτού του μέσου, δεν

είχαμε επιτυχή ενοφθαλμισμό των κυττάρων με αποτέλεσμα να μην έχουμε τυπική ανάπτυξη όγκων.

Μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων γινόταν σφικτική συρραφή της τομής, ώστε να εμποδίζεται απολύτως η διαρροή του ενοφθαλμισθέντος κυτταρικού εναιωρήματος έξω από την τομή. Κατόπιν το ζώο επέστρεφε στον κλωβό του, όπου παρέμεινε μόνο του για λίγες ώρες και παρακολουθούνταν έως ότου ανανήψει πλήρως. Τα ζώα που είχαν απολύτως ανανήψει τοποθετούνταν εκ νέου στους κλωβούς ανά τρία, λίγες ώρες μετά τους χειρισμούς, για την αποφυγή επεισοδίων κανιβαλισμού που είχαν σημειωθεί σε προκαταρκτικά πειράματα με θύματα τα ζώα που ακόμη βρισκόταν σε μεγάλη καταστολή και δεν μπορούσαν να αμυνθούν. Πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο πριν την διενέργεια της χειρουργικής τομής, όσο και μετά την τελική συρραφή αυτής, όλη η περιοχή της ράχης του ζώου απολυμναινόταν με αραιό διάλυμα ιωδιούχου αντισηπτικού ή αιθυλικής αλκοόλης.

Μετά τον ενοφθαλμισμό των καρκινικών κυττάρων τα ζώα παρακολουθούνταν επιμελώς, επί τρεις φορές την ημέρα και μετά την πάροδο τετραημέρου από τον ενοφθαλμισμό, γινόταν προσεκτική ψηλάφηση της περιοχής για την διαπίστωση της ανάπτυξης ή μη, κακοήθους μορφώματος.

Συνήθως μετά την πάροδο μιας εβδομάδος από την ημέρα του ενοφθαλμισμού των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, ο ψηλαφητικός έλεγχος έδειχνε την σαφή παρουσία όγκου, η ανάπτυξη του οποίου ήταν ταχύτατη. Τα ζώα, που όπως προείπαμε είχαν ήδη διαχωριστεί στην Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.) και στην Ομάδα Θεραπείας (Ο.Θ.).

Τα ζώα τα ανήκοντα στην Ομάδα Ελέγχου αφέθησαν χωρίς αγωγή και παρακολουθήθηκαν μέχρι την στιγμή του θανάτου αυτών, ενώ στην ομάδα της θεραπείας όταν ο όγκος του κάθε ζώου λάμβανε διαστάσεις 1 cm^3 άρχιζε η θεραπευτική παρέμβαση με την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μιας κατάλληλης ποσότητας εκχυλίσματος. Η δοσολογία του εκχυλίσματος εξατομικεύτηκε για κάθε ζώο και προσδιορίστηκε ως εξής:

Υπολογίστηκε κατ' αρχήν η ελάχιστη ποσότητα μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, που προκαλούσε θάνατο σε όλον τον κυτταρικό πληθυσμό του τρυβλίου, λαμβάνοντας υπ' όψιν τον όγκο του μέσου διασποράς των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, ο οποίος ήταν 3 ml. Κατόπιν κάθε ζώο

αναισθητοποιούταν με αιθέρα και γινόταν υπολογισμός του όγκου του σώματός του, όπως επίσης και του βάρους του.

Η ελάχιστη δόση θανάτου που είχε εξαχθεί από τον *in vitro* πειραματισμό διαιρούνταν δια του 3 (3 ml όγκος θρεπτικού μέσου διασποράς των καρκινικών κυττάρων στο τρυβλίο) και κατόπιν το πηλίκο, δηλαδή η ποσότητα εκχυλίσματος ανά ml πολλαπλασιαζόταν επί τον όγκο του σώματος του πειραματόζωου μετρημένο σε ml. Εφόσον προσδιορίσαμε τους σωματικούς όγκους και τα αντίστοιχα βάρη ενός μεγάλου αριθμού ζώων, υπολογίσαμε την σχέση μεταξύ βαρών και όγκων (νομόγραμμα βάρους – όγκου) και βάση αυτής χρησιμοποιήσαμε τα σχετικά βάρη για τον προσδιορισμό των εξατομικευμένων δόσεων.

Το αποτέλεσμα αυτού του πολλαπλασιασμού μας έδινε την ποσότητα του αποξηρανθέντος αιθανολικού εκχυλίσματος που έπρεπε να ενέσουμε ενδοπεριτοναϊκά σε κάθε ζώο, ώστε αν θεωρούσαμε τον συνολικό όγκο του ζώου, ως όγκο κατανομής των ουσιών του εκχυλίσματος να είχαμε μια αρχική ισοδυναμία με αυτήν που ίσχυσε στο τρυβλίο. Πρέπει εδώ να υπογραμμιστεί ότι η χρησιμοποίηση του βάρους του περιεχόμενου του τρυβλίου (καρκινικά κύτταρα + διατροφικό διάλυμα + χρησιμοποιηθείσα ποσότητα εκχυλίσματος) και η χρησιμοποίηση του βάρους του σώματος με τον ίδιο αναγωγικό τρόπο, έδειξε ότι και με αυτόν τον τρόπο οι ποσότητες εκχυλίσματος ήσαν αρκετά κοντά στις ποσότητες αυτού που είχαν υπολογιστεί με την μέθοδο της χρήσης των όγκων. Ωστόσο σχεδόν πάντοτε η μέθοδος υπολογισμού των ημερήσιων δόσεων ανά ζώο με την χρήση των όγκων έδινε μια μεγαλύτερη δόση (σχεδόν του επιπέδου του 10% επί πλέον), εν συγκρίσει με εκείνες που υπολογιζόταν βάσει του βάρους των ζώων. Για τον λόγο αυτής της διαφοράς προτιμήσαμε να υιοθετήσουμε τον υπολογισμό των δόσεων μέσω του όγκου του σώματος και όχι μέσω του βάρους αυτού.

Μετά τον υπολογισμό της δόσης ανά ζώο, η χορήγηση του εκχυλίσματος άρχισε να γίνεται με σταδιακότητα σε κάθε πειραματόζωο που είχε αναπτύξει καρκίνο.

Την πρώτη και δεύτερη ημέρα χορηγήσαμε το 1/3 της υπολογισθείσας δόσης, την τρίτη και πέμπτη μέρα χορηγήσαμε τα 2/3 και μετά την πέμπτη μέρα αρχίσαμε να χορηγούμε όλη την δόση. Εφ' όσον το ζώο εμφάνιζε καλή ανεκτικότητα στο εκχύλισμα, τότε αυξήσαμε εκ νέου σταδιακά την δόση μέχρι

διπλασιασμού αυτής και συνεχίσαμε την παρακολούθηση του πειράματος, μέχρις ότου θεωρήθηκε επαρκής ο χρόνος πειραματισμού και λήψης δεδομένων, οπότε και θυσιάσαμε τα ζώα για να δούμε τις μεταβολές του όγκου, των μεταστάσεων στα εσωτερικά όργανα, όπως επίσης και την κατάσταση των σπλάχνων αυτών και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πέρα από τα τυπικά μακροσκοπικά παθολογοανατομικά στοιχεία, έγιναν μικροσκοπικά παρασκευάσματα για την μελέτη της ιστοπαθολογίας των όγκων, των μεταστάσεων και της κατάστασης των εσωτερικών οργάνων.

Ε(4). ΜΕΛΕΤΗ *In Vivo* ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΣΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΩΣ 2×10^6 ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba*.

Φωτογραφίες 22 – 23 – 24 – 25 – 26 – 27 (Παράρτημα Ι – Σελ. 367 – 369).

Για την πραγματοποίηση αυτού του πειράματος, δηλαδή του κατά πόσον το εκχύλισμα εμφανίζει αντιμεταστατικές ιδιότητες, απέναντι στην αιματογενή μεταστατική διασπορά, χρησιμοποιήθηκαν 21 επίμυες Wistar, ηλικίας 90 ημερών και μέσου βάρους 175 g.

Οι επίμυες μοιράστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες ατόμων η κάθε μία, την ομάδα ελέγχου E1 με 10 άτομα και την ομάδα θεραπείας Θ1 με 11 άτομα. Οι επίμυες και των δύο ομάδων αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση κεταμίνης και μιδαζολάμης (10 και 5 mg ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος από την πρώτη και την δεύτερη αντιστοίχως).

Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας, σε όλα τα ζώα, έγινε αποκάλυψη μιας από τις δύο έξω σφαγίτιδες φλέβες, κατά κύριο λόγο από την δεξιά πλευρά, ενώ σε λίγες περιπτώσεις όπου η αποκάλυψη δεν πέτυχε, παρασκευάστηκε η αριστερή έξω σφαγίτιδα φλέβα. Κατόπιν έγινε καθετηριασμός της αποκεκαλυμμένης σφαγίτιδας και έγχυση στην φλεβική κυκλοφορία 500.000 λειομυοσαρκωματικών κυττάρων. Η έγχυση ήταν βραδεία και εφ' άπαξ. Το μέσον στο οποίο είχαν διασπαρθεί τα καρκινικά κύτταρα ήταν το διάλυμα Hank. Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα ήσαν ζωντανά και είχαν ληφθεί πριν λίγα λεπτά από σχετική κυτταροκαλλιέργεια.

Μετά την παρέλευση χρόνου 60 λεπτών από την ενδοφλέβια βραδεία έγχυση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, αφαιρέθηκε προσεκτικά ο φλεβοκαθετήρας, ώστε να μην προκληθεί αιμορραγία από τη σφαγίτιδα, η φλέβα πιέστηκε για λίγα λεπτά με αποστειρωμένο αιμοστατικό πίεστρο και εφ' όσον δεν σημείωσε απώλεια αίματος, τακτοποιήθηκε μέσα στους παρακείμενους μύες. Κατόπιν ακολούθησε συρραφή της τομής κατά στρώματα, ώστε να μην προκύπτει ισχυρή μηχανική πίεση επί της συγκεκριμένης περιοχής του λαιμού.

Τα ζώα αφέθηκαν να ανανήψουν σε κλωβούς του ενός ατόμου, προκειμένου να αποφευχθεί ο συνήθης μεταξύ τους κανιβαλισμός και μετά την παρέλευση εικοσιτετραώρου τοποθετήθηκαν ανά τρία άτομα, στους αρχικούς τους κλωβούς.

Μετά την παρέλευση 22 ημερών από την ενδοφλέβια έγχυση των καρκινικών κυττάρων αρχίσαμε να χορηγούμε στα πειραματόζωα το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών στις ακόλουθες δόσεις. Αρχικά τις πέντε πρώτες ημέρες δώσαμε πολύ μικρές ποσότητες που προσέγγιζαν τα λίγα mg ώστε να έχουμε πλήρη έλεγχο των τυχαίων παρενεργειών. Κατόπιν αυξήσαμε την δόση και χορηγούσαμε προσεγγιστικά το 1/3 της πλήρους δόσης, ήτοι 135,4 mg / kg βάρος σώματος, ώστε να έχουμε μια σταδιακή προσαρμογή των ζώων, χωρίς αυτά να στρεσαριστούν ισχυρά. Κατόπιν αυξήσαμε την δόση στα 270,85 mg / kg βάρους σώματος επί επτά ημέρες (2/3 της πλήρους δόσης) και εν συνεχεία καταλήξαμε στην τελική ανώτατη δόση που ήταν 406,25 mg / kg βάρος σώματος. Η δόση αυτή χορηγήθηκε επί 14 ημέρες. Συνολικά κάθε ζώο έλαβε προσεγγιστικά μια ποσότητα ξηρού εκχυλίσματος 1736 mg σε χρονικό διάστημα 34 ημερών.

Κατόπιν τα πειραματόζωα και των δύο ομάδων θυσιάστηκαν με την χορήγηση μεγάλης δόσης πεντοθάλης και υποβλήθηκαν σε νεκροτομή. Όλα τα εσωτερικά όργανα απομονώθηκαν, ζυγίστηκαν, φωτογραφήθηκαν μακροσκοπικά και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 8%.

Κατόπιν έγιναν παρασκευάσματα για την οπτική όλων των οργάνων, προκειμένου να μετρηθεί ο αριθμός των μεταστάσεων τους, εστιάζοντας κατά κύριο λόγο στους πνεύμονες, οι οποίοι έδειξαν σαφή εικόνα μακροσκοπικών δευτεροπαθών εντοπίσεων, εν συγκρίσει προς τα άλλα εσωτερικά όργανα. Οι μεταστατικές εστίες μετρήθηκαν σε δύο παρασκευάσματα πνεύμονα, ανά

πειραματόζωο, προερχόμενα από μια οβελιαία και μια εγκάρσια τομή του ομόπλευρου προς την χρησιμοποιηθείσα σφαγίτιδα φλέβα οργάνου. Επίσης, συχνά, εξετάστηκε και ο ετερόπλευρος πνεύμονας. Η επιλογή του ομόπλευρου πνεύμονα έγινε αυθαίρετα.

Ε(5). ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΠΟΥ ΕΓΙΝΑΝ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΕΙΣ ΜΕΣΩ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ B[a]P.

Φωτογραφίες 28 – 29 – 30 – 31 – 32 – 33 – 34 (Παράρτημα Ι – Σελ. 370 – 372).

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήσαμε 16 επίμυες Wistar (ισάριθμα άτομα και των δύο φύλων), ηλικίας 60 ημερών και βαρών που κυμαίνονταν μεταξύ 104 και 152 g. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με διαιθυλικό αιθέρα σε κώδωνα αναισθησίας και σε κάθε ένα απ' αυτά, έγινε υποδόρια έγχυση 10,08 mg B[a]P / ml τρικαπριλίνης.

Η περιοχή εισόδου της βελόνας συρράφτηκε με μεταλλικό κλιπ ώστε να μην προκύψει έξοδος του B[a]P από τον υποδόριο ιστό στον οποίον ενέθηκε. Το καρκινογόνο εισήλθε στην ενδιάμεση περιοχή μεταξύ δέρματος και υποκείμενων μυών, εξαπλούμενο με ήπια μάλαξη επί των συνδετικών ιστών (περιτοναίεις) που διαχωρίζουν τους μύες από το χόριο του δέρματος.

Η περιοχή στην οποία ενέθηκε το καρκινογόνο επιλέχτηκε να είναι σταθερά σε όλες τις περιπτώσεις και ήταν η ενδιάμεση ζώνη μεταξύ του μέσου της ωμοπλάτης και της σπονδυλικής στήλης στο αντίστοιχο ύψος της. Στην περίπτωση που η έγχυση γινόταν ελλειπής ή η βελόνη διατρύπωσε την μυϊκή στοιβάδα, το πειραματόζωο παρακολουθούνταν μεν, αλλά ξεχωριστά από την Ομάδας Ελέγχου.

Μετά τη χορήγηση του καρκινογόνου, τα πειραματόζωα διαμοιράστηκαν σε κλωβούς, όπου ο καθένας περιείχε τρία ζώα, όλα πάντοτε, του ίδιου φύλλου.

Τρεις εβδομάδες μετά την χορήγηση του καρκινογόνου, εκτός από τον ημερήσιο οπτικό έλεγχο, τα ζώα υποβαλλόταν και σε ψηλαφητικό έλεγχο, προκειμένου να διαπιστωθεί αν αναπτυσσόταν κακοήθης όγκος πλέον σε

μακροσκοπικό επίπεδο. Ο διαρκής έλεγχος έδειξε ότι τα πρώτα κακοήθη μορφώματα άρχισαν να αναπτύσσονται γύρω στις ενενήντα ημέρες μετά την χορήγηση του B[a]P.

Όταν ο αναπτυσσόμενος όγκος προσέγγιζε τις διαστάσεις των 2 X 2 cm, το ζώο ετίθετο πλέον σε έναν ξεχωριστό κλωβό (Θεραπευτική Ομάδα) και άρχιζε να υποβάλλεται σε θεραπευτική αγωγή με το μικτό εκχύλισμα *Viscum album* + *Abies alba* (50% : 50%).

Συνολικά τα ζώα διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στην Ομάδα Ελέγχου, στην οποία τα καρκινοπαθή πειραματόζωα λάμβαναν ενδοπεριτοναϊκά μια ποσότητα φυσιολογικού ορού ίση προς την ποσότητα του διαλύτη (φυσιολογικός ορός) στην οποία διαλύαμε το ξηρανθέν σε ρεύμα αζώτου εκχύλισμα.

Η δόση την οποία χορηγούσαμε σε κάθε πειραματόζωο κυμαινόταν στα 110 mg ± 10 mg, αναλόγως του συνολικού σωματικού όγκου του ζώου, ο οποίος υπολογιζόταν με την αρχή του Αρχιμήδους, όπως περιγράψαμε παραπάνω. Η χορήγηση του θεραπευτικού εκχυλίσματος διήρκεσε επί 35 ημέρες.

Κατόπιν τα ζώα θυσιάστηκαν, νεκροτομήθηκαν, έγινε απομόνωση του κυρίου όγκου, τεμαχισμός αυτού και μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης 8%. Επίσης έγινε παρασκευή όλων των σπλάχνων του σώματος, όπως επίσης και του εγκεφάλου για τον εντοπισμό και την καταμέτρηση των υπαρχουσών μεταστάσεων. Οι δύο ομάδες πειραματοζώων, δηλαδή η ομάδα ελέγχου και η ομάδα θεραπείας συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς μια σειρά παραμέτρων εκτίμησης της πορείας της νεοπλασματικής νόσου.

Ε(6). ΔΟΚΙΜΗ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba*.

Σε μια σειρά επίμυων Wistar χορηγήσαμε ενδοπεριτοναϊκώς ποσότητες μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, οι οποίες αυξανόταν λογαριθμικά: 1 mg σε τρία ζώα, 10 mg σε τρία ζώα, 100 mg σε τρία ζώα κ.ο.κ. Τα ζώα που κατέληξαν νεκροτομήθηκαν, τα σπλάχνα τους μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και μελετήθηκαν παθολογοανατομικά για την εξακρίβωση της αιτίας θανάτου.

Εφ' όσον προσδιορίστηκε η LD₅₀ επιλέχτηκε μια ασφαλής δόση εκχυλίσματος η οποία χορηγήθηκε για μεγάλο διάστημα ενδοπεριτοναϊκώς, προκειμένου να δοκιμάσουμε την χρόνια τοξικότητα αυτής στον επίμυ Wistar.

Ε(7). ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Για την πραγματοποίηση του εν λόγω πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 30 φυσιολογικοί ώριμοι επίμυες Wistar ηλικίας 6 μηνών, οι οποίοι είχαν περατώσει την σωματική ανάπτυξή τους. Η εν λόγω ομάδα πειραματοζώων περιλάμβανε ισάριθμες υποομάδες αρρένων και θηλέων ατόμων, προερχομένων από κοινούς προπάτορες.

Τα ζώα κατανεμήθηκαν σε δύο ίσες ομάδες, ισάριθμων αρρένων και θηλέων ατόμων και παρακολούθηθηκαν επί 42 ημέρες ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε περαιτέρω σωματική ανάπτυξη. Οι ομάδες αυτές ήσαν η Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.) και η Ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.).

Στην Ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας άρχισε να χορηγείται ενδοπεριτοναϊκά ποσότητα 152,8 mg / kg b.w. εκχυλίσματος, ενώ τις υπόλοιπες 55 ημέρες χορηγήσαμε σταδιακά αυξανόμενες ποσότητες μικτού εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba*, οι οποίες ήσαν: 305,56 mg / kg b.w. / day (7 μέρες), 458,32 mg / kg b.w. / day (20 ημέρες) και 916,68 mg / kg b.w. / day (28 ημέρες) και το οποίο είχε υποστεί απομάκρυνση της αιθανόλης, επαναδιάλυση σε φυσιολογικό ορό και αποστείρωση με φίλτρο κατακράτησης μικροβίων. Η όλη ποσότητα της ημερήσιας δόσης του εκχυλίσματος, ανά πειραματόζωο, περιεχόταν σε 2 ml φυσιολογικού ορού. Την ίδια ποσότητα φυσιολογικού ορού ενίσαμε ανά πειραματόζωο, ανά ημέρα στην Ομάδα Ελέγχου.

Την τελευταία ημέρα της χορήγησης του εκχυλίσματος στην Ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας και στην Ομάδα Ελέγχου, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με την χρήση ενός συνδυασμού κεταμίνης και μιδαζολάμης, έγινε αποκάλυψη των έξω σφαγίτιδων φλεβών στο επίπεδο της κλείδας και αιμοληψία 2 έως 3 cm³ αίματος σε αντιπηκτικό EDTA. Στο αίμα έγινε προσδιορισμός των έμμορφων συστατικών αυτού, όπως επίσης και των παραμέτρων των σχετικών με την αιμοσφαιρίνη και τα ερυθροκύτταρα.

Επίσης τα ζώα και των δύο ομάδων παρακολουθήθηκαν ως προς τις μεταβολές του βάρους αυτών, ζυγίζόμενα σε τακτούς χρόνους. Ίσοι αριθμοί ζώων και από τις δύο ομάδες τοποθετήθηκαν εντός μεταβολικών κλωβών για την καταμέτρηση των καταναλισκομένων ποσοτήτων ύδατος και τροφής, όπως επίσης για τον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας των απεκκρινόμενων ούρων και κοπράνων ημερησίως.

Κατά την αναισθητοποίηση, μετά το πέρας της αιμοληψίας και υπό συνεχή ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση, χορηγήσαμε στα πειραματόζωα ποσότητα 200 mg ξυλοκαΐνης για την πρόκληση καρδιακής ανακοπής.

Μετά την διαπίστωση του θανάτου και την παρέλευση μερικών ωρών από αυτόν, τα ζώα νεκροτομήθηκαν και ελέγχθηκαν τα εσωτερικά όργανα, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου. Μελετήθηκε η μακροσκοπική μορφολογία και καταγράφηκε το βάρος των οργάνων, ενώ εν συνεχεία αυτά τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 8 % για μονιμοποίηση και κατόπιν εγκλείστηκαν σε παραφίνη και κόπηκαν σε λεπτές φέτες για μικροσκοπικό παθολογοανατομικό έλεγχο.

Τα δεδομένα που προέκυψαν φαίνονται στο αντίστοιχο τμήμα του κεφαλαίου των αποτελεσμάτων των *in vivo* πειραμάτων.

Ε(8). ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ – ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Για τα εν λόγω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 40 επίμυες Wistar, ηλικίας 60 ημερών και βάρους 95 – 120 g, στους οποίους χορηγήθηκε υποδορίως (περιοχή δεξιάς ωμοπλάτης) ποσότητα 3,4-βενζοπυρενίου 10,08 mg / ml τρικαπριλίνης.

Αμέσως μετά την χορήγηση του καρκινογόνου τα πειραματόζωα άρχισαν να λαμβάνουν σε καθημερινή βάση ένα υδατικό εκχύλισμα των δύο φυτών (50 ml / kg βάρους σώματος / ημέρα). Η χορήγηση αυτού γινόταν αντί ποσίμου ύδατος. Η χορήγηση συνεχίστηκε εφ' όρου ζωής των πειραματοζώων.

Τα πειραματόζωα που ανέπτυξαν όγκο, όταν έφταναν στην τελική φάση της νόσου απομονωνόταν σε ειδικούς κλωβούς μέχρι του θανάτου τους, για την αποφυγή κανιβαλισμού. Τα ζώα αμέσως μετά τον θάνατό τους νεκροτομούνταν, οι όγκοι και τα σπλάχνα τους μονιμοποιούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 8 % και κατόπιν γινόταν παθολογοανατομικός έλεγχος αυτών για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με τον τύπο του όγκου, του πλήθους των μεταστάσεων και των αιτιών του θανάτου τους.

Ε(9). ΠΕΙΡΑΜΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ W1STAR ΠΟΥ ΑΝΕΠΤΥΞΑΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΜΕ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ B[a]P ΥΠΟΔΟΡΙΩΣ.

Σε 5 πειραματόζωα προκαλέσαμε χημική καρκινογένεση χορηγώντας B[a]P υποδορίως, στη ποσότητα των 10,08 mg B[a]P ανά πειραματόζωο, πάντοτε στο ίδιο ανατομικό σημείο (στο μέσο της δεξιάς ωμοπλάτης).

Τα ζώα αφέθηκαν να αναπτύξουν όγκους κι όταν ο καθένας εξ αυτών λάμβανε διαστάσεις 2 X 2 cm, το ζώο που έφερε το συγκεκριμένο όγκο, απομονωνόταν σε ξεχωριστό κλουβί και άρχισε να λαμβάνει ως μοναδικό πόσιμο διάλυμα, φρέσκο μικτό υδατικό εκχύλισμα. Η χορήγηση του εκχυλίσματος έλαβε χώρα σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια επιβίωσης των ζώων.

Μετά το θάνατο των πειραματόζωων γινόταν νεκροτομή, αφαίρεση και μονιμοποίηση σε φορμαλδεΐδη 8 % των όγκων και των σπλάχνων και παθολογοανατομικός έλεγχος επί των παρασκευασμάτων.

Σαν Ομάδα Ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα 18 Ζώα του πειράματος B8, στα οποία έγινε επίσης χημική καρκινογένεση με B[a]P και τα οποία λάμβαναν μόνο νερό εκ του υδραγωγού.

Ε(10). ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΕΝΟΣ ΛΕΙΟΦΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ L-210.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης της κυτταροτοξικής ικανότητας ενός λειοφυλιωμένου υδατικού εκχυλίσματος των δύο φυτών *Viscum album* + *Abies alba* χρησιμοποιήθηκε η σειρά νεοπλασματικών κυττάρων L – 210.

Τα εν λόγω κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστή κυττάρων υπό στείρες συνθήκες, θερμοκρασία 37°C, O₂ 95% και CO₂ 5%, με την χρήση του καλλιεργητικού μέσου RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Paisley, Scotland, GB), που συμπληρώθηκε με βόειο εμβρυακό ορό 10%, 2 mM L-γλουταμίνη, πενικιλίνη (100 μονάδες), στρεπτομυκίνη (100 µg / ml) και 10 mM HEPES (pH = 7,4). Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε βαθμιαία αυξανόμενες συγκεντρώσεις λειοφυλιωμένου εκχυλίσματος επί τρεις φορές για 48 ώρες.

Η κυτταροτοξικότητα, ως αναστολή της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, υπολογίστηκε με την χρήση της μεθόδου MTT (microculture tetrazolium assay), ενώ τα δεδομένα εκφράστηκαν σε IC₅₀, δηλαδή ως την συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί την κατά 50% μείωση της οπτικής πυκνότητας των παρασκευασμάτων των εν λόγω κυττάρων, που έλαβαν το παρασκεύασμα των δύο φυτών, ως προς τα κύτταρα ελέγχου που δεν έλαβαν παρά τον διαλύτη (νερό).

α) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ L-210.

Μεγάλες και ίσες ποσότητες φύλλων και πράσινων κλαδιών των φυτών *Viscum album* και *Abies alba* πολτοποιήθηκαν με μπλέντερ παρουσία μικρών ποσοτήτων δισαπτεσταγμένου νερού, προκειμένου να κινούνται οι λεπίδες του θρυμματιστή. Κατόπιν ο πολτός εκχειλίστηκε με νερό 90 °C επί 120 λεπτά υπό συνθήκες διαρκούς ανάδευσης και εν συνεχεία αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά την αποκατάσταση της θερμικής ισορροπίας έγινε απομάκρυνση των θρυμμάτων των φυτών και διήθηση του εκχυλίσματος με την χρήση αποστειρωμένων γαζών. Μια ποσότητα του εκχυλίσματος διηθήθηκε με αντιμικροβιακό φίλτρο ώστε να προκύψει αποστείρωση του διαλύματος. Κατόπιν ογκομετρήθηκε με ακρίβεια και τοποθετήθηκε σε μια αποστειρωμένη κατάλληλη φιάλη που ετέθη στον θάλαμο εξάχνωσης ενός ισχυρού λειοφυλιωτή και έγινε αστραπιαία εκτόνωση με μηδενισμό της ατμοσφαιρικής πίεσης και ταυτόχρονη κατακρήμνιση της θερμοκρασίας του θαλάμου της συσκευής στους – 50 °C.

Η διαδικασία οδήγησε στην δημιουργία ενός προϊόντος που λειοτριβήθηκε και κονιοποιήθηκε με στείρο τρόπο. Η στειρότητα ελέγχθηκε με ανάπτυξη πλήρους μικροβιακής χλωρίδας, η οποία υπήρξε μηδενική. Το λειοφυλιωμένο εκχύλισμα φυλάχτηκε σε αεροστεγώς σφραγισμένες αμπούλες που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τις κυτταροκαλλιέργειες.

Το υπόλοιπο εκχύλισμα καταψύχθηκε στους $- 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ εντός κατάλληλων στεγανών φιαλών στον αεροθάλαμο των οποίων είχε εμφυσηθεί άζωτο αέριο ή Αργό.

Οι φιάλες χρησιμοποιήθηκαν για την τροφοδοσία με εκχύλισμα πέντε επίμυων Wistar οι οποίοι είχαν υποστεί χημική καρκινογένεση με Β[α]Ρ και άρχισαν να τροφοδοτούνται με ένα διάλυμα που περιείχε 50 % εκχυλίσματος και 50 % νερού της βρύσης.

ΣΤ. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ *ex vivo* ΚΑΙ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ *in vitro*.

ΣΤ(1). ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΕΛΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΣΩΡΕΥΟΜΕΤΡΟ.

Για την μελέτη των δράσεων των μικτών εκχυλισμάτων των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba*, στις λειτουργικές αντιδράσεις των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν τα τυπικά αιθανολικά εκχυλίσματα των εν λόγω φυτών τα οποία παρασκευάστηκαν με το γνωστό τρόπο, όπως περιγράφεται σε άλλο σημείο του παρόντος κεφαλαίου.

Το δοχείο συλλογής του εκχυλίσματος, πριν την λήψη του, αναδεύονταν ισχυρά και κατόπιν λαμβάναμε μια ποσότητα $20 - 50 \text{ cm}^3$ αιθανολικού εκχυλίσματος, σε καθαρό ογκομετρικό κύλινδρο. Κατόπιν γινόταν μεταφορά $5 \text{ έως } 10 \text{ cm}^3$ του υπό δοκιμή μικτού εκχυλίσματος, σε υψηλό γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίον εισερχόταν το ακροφύσιο ενός σωληνίσκου (ειδική κατασκευή με την οποία διώχναμε την αιθυλική αλκοόλη απ' το εκχύλισμά μας και η οποία περιγράφεται σε άλλο σημείο του παρόντος) συνδεδεμένου με την έξοδο φιάλης του αζώτου (100%).

Λίγη ώρα πριν την χρήση του ξηρού εκχυλίσματος, γινόταν αποσφράγιση του δοκιμαστικού σωλήνα από το parafilm και τοποθέτηση στο εσωτερικό του 5 έως 10 ml φυσιολογικού ορού (ανάλογα με την αρχική ποσότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος). Στη συνέχεια γινόταν προσεκτική επαναδιαλυτοποίηση του ξηρού υπολείμματος στον προστιθέμενο ορό και κατόπιν γινόταν ισχυρή ανάδευση, για 5 λεπτά τουλάχιστον, του ανασυσταθέντος εκχυλίσματος (Vortex), μέχρι να ομογενοποιηθεί ικανοποιητικά. Εν συνεχεία το ανασυσταθέν με φυσιολογικό ορό εκχύλισμα υφίστατο διήθηση μέσω ηθμού κατακράτησης μικροβίων (ηθμός αποστείρωσης) και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο πωματίζονταν και τοποθετούνταν μεταξύ θρυμμάτων πάγου, καθ' όλη την διάρκεια της χρήσης του. Με την χρησιμοποίηση αυτόματου βαθμονομημένου σιφωνίου, γινόταν απαγωγή μικροποσοτήτων του εν λόγω εκχυλίσματος (1 έως 50 μl) τα οποία τοποθετούνταν κάθε φορά στο εσωτερικό κατάλληλης κυψελίδας όγκου 500 μl για την δοκιμή της δράσης αυτού στις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις.

ΣΤ(2). ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.

α) Δότες και αιμοληψίες.

Για τα εν λόγω πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 12 υγιείς εθελοντές (5 γυναίκες και 7 άντρες), ηλικίας 24 έως 48 ετών, μη καπνιστές, οι οποίοι απείχαν από την κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών τουλάχιστον επτά ημέρες πριν από κάθε αιμοληψία.

Επίσης οι εθελοντές απείχαν από την σταθερή ή περιστασιακή χρήση συμπληρωμάτων διατροφής ή φαρμάκων τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν την αιμοληψία.

Η αιμοληψία γινόταν από την μεσοβασιλική φλέβα του αντιβραχίονα, ή από τις επιπολής φλέβες της ραχιαίας επιφάνειας της άκρης του χεριού, με την χρήση πλαστικοποιημένου φλεβοκαθετήρα ή πεταλούδας, δια ελεύθερης ροής και όχι δια αναρροφήσεως, ώστε τα αιμοπετάλια να μην υφίστανται υδραυλικό stress ροής (shear stress) και ενεργοποιούνται.

Το αίμα συλλεγόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες νοσοκομειακής χρήσης, τυποποιημένους για την συλλογή αίματος, που προορίζονταν για αιματολογικό έλεγχο και χωρητικότητας 5 cm³ με την αντίστοιχη ποσότητα κιτρικών ως αντιπηκτικού (1 cm³ διαλύματος κιτρικών 0,2 % ανά 9 cm³ αίματος).

Σε αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης δοκιμαστικοί σωλήνες από νεοπρένιο των 10 cm³ με την αντίστοιχη ποσότητα του ίδιου αντιπηκτικού διαλύματος.

β) Παρασκευή των αιμοπεταλίων [προπαρασκευή Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) και Πτωχού σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PPP)].

Αμέσως μετά την αιμοληψία το αίμα αναδεύεται ήπια, ώστε να γίνει πλήρης ανάμιξή του με το αντιπηκτικό και αφού αφήνεται 5 έως 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετούνται κατόπιν σε φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές ανά λεπτό, πάντα με την ίδια φυγόκεντρο, επί 10 λεπτά.

Μερικές φορές γινόταν συνέχιση της φυγοκέντρησης ώστε να υπάρξει πλήρης διαχωρισμός του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (PRP) από την στοιβάδα των ερυθροκυττάρων και την λεπτή στοιβάδα των λευκοκυττάρων (buffy coat).

Κατόπιν γινόταν επιμελής αναρρόφηση του Πλούσιου σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PRP) μέχρι 2 – 4 mm πάνω από την γραμμή διαχωρισμού των ερυθροκυττάρων, ώστε να μην αναρροφηθούν και λευκοκύτταρα, των οποίων η παρουσία, ως γνωστόν, παραλλάσσει την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα.

Το αναρροφούμενο PRP τοποθετούνταν σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα, πωματίζονταν και φυλάσσονταν σε στατή εντός υδατόλουτρου θερμοκρασίας 37° C, μέχρι την δοκιμασία των αιμοπεταλίων, η οποία άρχιζε όχι αργότερα από 20 έως 30 min, μετά την λήψη του αίματος.

Συνήθως δεν γινόταν αιμοληψίες μεγαλύτερες των 15 – 20 cm³ ώστε η παραμονή των αιμοπεταλίων εκτός του σώματος, να μην υπερβεί τις 2 έως 3 ώρες και υποστούν αλλοιώσεις οι λειτουργικές τους αντιδράσεις.

Μετά την παραλαβή του PRP, το εναπομείναν δείγμα αίματος, ετέθη εκ νέου σε φυγοκέντρηση στις 3100 στροφές ανά λεπτό επί 20 min, ώστε να

γίνει ολοκληρωτική κατακρήμνιση και των υπολοίπων σε αιώρηση αιμοπεταλίων, και να προκύψει το Πτωχό σε Αιμοπετάλια Πλάσμα (PPP), το οποίο είναι απαραίτητο για την ρύθμιση του σημείου του άνω άκρου του διαγράμματος συσσώρευσης, στο συσσωρευόμετρο.

γ) Περιγραφή του συσσωρευόμετρου και της μεθόδου μελέτης των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων *ex vivo* και *in vitro*.

Η συσσωρευομετρία αποτελεί μια ενόργανη (instrumental) μέθοδο για την ακριβή ποσοτική και ποιοτική μελέτη των τριών κυρίων αιμοπεταλιακών αντιδράσεων. Η μέθοδος αυτή επινοήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον έλεγχο ρουτίνας των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, όπως επίσης και για ερευνητικές εφαρμογές που αφορούν την τροποποίηση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας σε διάφορες κλινικές καταστάσεις (π.χ θρομβασθένειες ή θρομβοφιλίες) ή για την δοκιμή της δράσης παραγόντων με τροποποιητικές ιδιότητες επί των αιμοπεταλιακών λειτουργιών (αναστολείς ενζύμων, ουσίες με ανασταλτικές ή διεγερτικές ιδιότητες, αναστολείς υποδοχέων κ.α.).

Το συσσωρευόμετρο (aggregometer) περιλαμβάνει το κύριο όργανο το οποίο περιέχει μια ενσωματωμένη λυχνία λευκού φωτός σταθερής έντασης και δέσμης παράλληλης. Είναι φανερό ότι, με τις κατάλληλες τροποποιήσεις, δηλαδή με την χρήση μονοχρωμάτορα, είναι δυνατόν να επιλέξει κανείς οποιοδήποτε μήκος του ορατού φωτός ή της ακτινοβολίας UV, στο βαθμό που υπάρχει μια αντίστοιχη μελετητική αναγκαιότητα. Η λευκή λυχνία εκπέμπει μέσω μιας κυκλικής θυρίδας διαμέτρου 1 cm στο εσωτερικό ενός κυλινδρικού φρεατίου, το οποίο αποτελεί και την σχισμή του οργάνου. Η απόσταση από την έξοδο του φωτός μέχρι το απέναντι σημείο του φρεατίου είναι 0,5 cm. Στην απέναντι της φωτεινής εξόδου της λυχνίας πλευρά του φρεατίου είναι εγκατεστημένο ένα φωτοκύτταρο το οποίο είναι κατάλληλα διαμορφωμένο ώστε να διακρίνει αναλογικά όλες τις διαβαθμίσεις της έντασης του φωτός και να τις μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

Τα συγκεκριμένα διαμορφούμενα ηλεκτρικά σήματα ενεργοποιούν έναν πλωτήρα ο οποίος καταγράφει τις φωτεινές διακυμάνσεις που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό της κυψελίδας, η οποία εμπεριέχει τα αιμοπετάλια και

προφανώς καταγράφει τον βαθμό διαφάνειας (θολερότητα) του αιμοπεταλιακού εναιωρήματος.

Ακριβώς κάτω από το δάπεδο του πυθμένα του φρεατίου, που αντιπροσωπεύει την σχισμή της συσκευής, είναι τοποθετημένος ένας ηλεκτρικός τροχίσκος, ο οποίος περιέχει πυκνές ακτίνες από σιδηρομαγνητικό υλικό. Η ταχύτητα περιστροφής του τροχίσκου ρυθμίζεται εξωτερικά από κατάλληλο κοχλία, τοποθετημένου στον πίνακα ελέγχου της συσκευής, σε ένα εύρος στροφών από 0 έως 3000 rpm [rpm = rotations per minutes, (0, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 rpm)].

Στην σχισμή του οργάνου τοποθετούμε την κυψελίδα με 450 μl αιμοπεταλιακού εναιωρήματος και θέτουμε εντός της κυψελίδας μικρό πλαστικοποιημένο μαγνήτη, ικανό να περιστρέφεται ανεμπόδιστα στο εσωτερικό της, και ρυθμίζουμε την ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη - και συνεπώς του PRP - στις 1500 rpm, ανάβοντας ταυτόχρονα την λυχνία της συσκευής. Επειδή τα εν αιωρήσει αιμοπετάλια σκεδάζουν το φως, δημιουργείται το λεγόμενο φαινόμενο Tyndal, οπότε το σύνολο του PRP εμφανίζει μια χαρακτηριστική λευκωπή θολερότητα. Το αισθητήριο φωτοκύτταρο καταγράφει την οπτική διαπερατότητα του διαλύματος, δίνοντας ταυτόχρονα και το χαμηλότερο σημείο της καταγραφής, δηλαδή το σημείο με την ένδειξη 0 στον βαθμονομημένο καταγραφικό χάρτη. Κατόπιν αφαιρούμε από την σχισμή της συσκευής την κυψελίδα με το PRP και θέτουμε εντός της σχισμής μια νέα κυψελίδα η οποία περιέχει το Πτωχό σε Αιμοπετάλια Πλάσμα (PPP), το οποίο, επειδή ακριβώς δεν περιέχει καθόλου αιμοπετάλια, αφήνει το λευκό φως να διέλθει ανεμπόδιστα δια της μάζας του πλάσματος και να καταγραφεί από τον αισθητήρα. Σε αυτή την περίπτωση η γραφίδα του καταγραφέα ανέρχεται στην ένδειξη 100 του βαθμονομημένου χάρτη.

Το σημείο μηδέν αντιστοιχεί λοιπόν σε αιμοπετάλια τα οποία είναι απολύτως διαχωρισμένα (δηλαδή έχουν 0% συσσώρευση), ενώ το σημείο 100 αντιστοιχεί σε αιμοπετάλια τα οποία έχουν εξ ολοκλήρου συσσωρευτεί μεταξύ τους, σχηματίζοντας μικρότερους ή μεγαλύτερους λευκούς θρόμβους (δηλαδή συσσώρευση 100% του συνόλου των αιμοπεταλίων).

δ) Τυπικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών συσσωρευογραφημάτων.

Από την στιγμή που θα χορηγηθεί ένας τυπικός αγωνιστής στα περιδινούμενα αιμοπετάλια του PRP αυτά αρχίζουν να δίνουν τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις που αντιπροσωπεύουν τα διαδοχικά στάδια της ενεργοποίησής τους:

1^{ον}) Η πρώτη λειτουργική αντίδραση – η αλλαγή σχήματος – με την χαρακτηριστική εικόνα μιας μικρής ημικυκλικής ταπείνωσης του γραφήματος. Η μικρή αυτή ταπείνωση αντιστοιχεί στην αύξηση της οπτικής απορρόφησης του κυτταρικού εναιωρήματος, καθόσον τα διογκούμενα αιμοπετάλια προβάλλουν μεγαλύτερη δυσχέρεια στην διέλευση του φωτός, καταλαμβάνοντας περισσότερο χώρο και μειώνοντας τις κενές μεταξύ των αιμοπεταλίων αποστάσεις. Αν το ερέθισμα που χορηγήθηκε είναι πολύ μικρό (υποκατώφλιο), η αλλαγή σχήματος παρέρχεται και η γραμμή που αντιστοιχεί στην θολερότητα του εναιωρήματος επιστρέφει από την αρνητική της τιμή στην τιμή 0.

2^{ον}) Αν το ερέθισμα (ποσότητα αγωνιστή) υπερβαίνει την οδό διέγερσης των αιμοπεταλίων αλλά είναι ακόμη μικρό, τότε σε μικρή απόσταση από την αλλαγή σχήματος, η γραμμή αποτύπωσης της θολερότητας αρχίζει να λαμβάνει ανοδική κατεύθυνση και ανέρχεται μέχρι ενός σημείου, μετά από το οποίο κάμπτεται και επιστρέφει σε ένα σημείο περιεχόμενο μεταξύ του μηδενός και του 5 έως 20%. Η περιοχή της ανοδικής καμπύλης αποτελεί το λεγόμενο κύμα α της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε το φαινόμενο της αντιστρεπτής αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Αν λάβουμε το PRP και το ελέγξουμε στο μικροσκόπιο θα παρατηρήσουμε ότι η πλειονότητα των αιμοπεταλίων παραμένει διαχωρισμένη, ενώ ένας αριθμός τους έχει συγκροτήσει συσσωματώματα αποτελούμενα από μικρούς αριθμούς συγκολλημένων αιμοπεταλιακών κυττάρων.

3^{ον}) Αν η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου διεγέρτη είναι επαρκής ώστε να καταλάβει όλους τους εξειδικευμένους της υποδοχείς τότε η αιμοπεταλιακή διέγερση γίνεται μέγιστη και περνά από όλα τα διαδοχικά

στάδια αυτής: αλλαγή σχήματος, α κύμα συσσώρευσης, αντίδραση έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων και β κύμα συσσώρευσης.

Στην περίπτωση που διακρίνουμε την ύπαρξη των δύο κυμάτων συσσώρευσης, όπως σε άλλες περιπτώσεις, όπου τα φαινόμενα έχουν μεγάλη ταχύτητα τα δύο κύματα συντήκονται και σχηματίζουν μια ενιαία σιγμοειδή γραμμή.

Τα αιμοπετάλια στην τελευταία αυτή περίπτωση είναι όλα συνδεδεμένα μεταξύ τους και η συσσώρευσή τους δεν είναι πλέον αντιστρέψιμη, πράγμα το οποίο καταδεικνύεται από την σταθερότητα της γραμμής συσσώρευσης που αντιστοιχεί στην πολύ μικρή θολερότητα του Πτωχού σε Αιμοπετάλια Πλάσματος (PPP - plasma poor platelets). Δεν έχει νόημα να χορηγούμε στα αιμοπεταλιακά εναιωρήματα μεγαλύτερες ποσότητες ενός αγωνιστή από την συγκεκριμένη ποσότητα του, η οποία προκαλεί την μέγιστη αιμοπεταλιακή συσσώρευση, καθόσον η προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων δεν μεταφράζεται σε αύξηση του ύψους της συσσώρευσης. Στην εν λόγω περίπτωση όλοι οι υποδοχείς του εν λόγω αγωνιστή έχουν καταληφθεί και η προσθήκη άλλων ποσοτήτων εξ αυτού δεν μεταβάλλει το καθεστώς της κατάληψης των υποδοχέων ανοδικά.

4^{ον}) Πέραν των ανωτέρω αναφερθέντων, πολύ μεγάλο ρόλο παίζουν και οι ταχύτητες με τις οποίες σχηματίζονται οι αιμοπεταλιακοί θρόμβοι. Στην περίπτωση που η ταχύτητα δημιουργίας των συσσωματωμάτων είναι υψηλή, τότε η κλίση της γραμμής συσσώρευσης (γωνία που προκύπτει από τον άξονα του χρόνου και της εφαπτόμενης προς την γραμμή συσσώρευσης στην αρχή αυτής) είναι μεγάλη. Οι εν λόγω συσσωρεύσεις είναι απότομες και ανέρχονται στην περιοχή του οροπεδίου μέσα σε μικρό χρόνο από την στιγμή της χορήγησης του αγωνιστή. Στην περίπτωση αυτή ο αγωνιστής είναι ισχυρός (ή εναλλακτικά η ποσότητά του είναι μεγάλη). Αν, αντιθέτως τα αιμοπετάλια αργούν να συσσωρευτούν τότε η γραμμή της συσσώρευσης καθυστερεί αρκετά στο να φθάσει στην περιοχή της μέγιστης συσσώρευσης (περιοχή οροπεδίου).

5^{ον}) Το μέγεθος των θρόμβων είναι χρήσιμο στοιχείο για την εκτίμηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Το μέγεθος των θρόμβων μπορεί να εκτιμηθεί από τις διαστάσεις της ταλάντωσης του γραφήματος γύρω από την λεγόμενη μέση γραμμή πορείας.

Η μελέτη των συσσωρευογραφήματων δείχνει ότι αυτά αποτελούνται από μια γραμμή η οποία μπορεί να είναι συνεχής και χωρίς μικρές ταλαντώσεις, αλλά μπορεί να παρουσιάζει και ταλαντώσεις αξιόλογου εύρους, οι οποίες δίνουν στην γραμμή του συσσωρευογραφήματος μια πριονωτή εικόνα.

Όσο μεγαλύτεροι είναι οι λευκοί αιμοπεταλιακοί θρόμβοι τόσο μεγαλύτερο είναι το εύρος της πριονωτής γραμμής.

Για παράδειγμα, οι λευκοί θρόμβοι που σχηματίζονται εκ μέρους της ριστοσεΐνης είναι ευμεγέθεις, πράγμα το οποίο αντικατοπτρίζεται στο πολύ μεγάλο εύρος της πριονωτής γραμμής του συσσωρευογραφήματος.

Επίσης οι ευμεγέθεις θρόμβοι της προκαλούμενης, από την ριστοσεΐνη, συσσώρευσης είναι και πολυπληθείς οπότε οι διαδοχικές οδοντώσεις του συσσωρευογραφήματος είναι ιδιαίτερος πυκνές.

Αντίθετα στην συσσώρευση που εισάγεται από το ADP ή το αραχιδονικό οξύ η οδόντωση του γραφήματος είναι πολύ μικρή ή λείπει εντελώς.

Πέραν της πυκνότητας και του ύψους της οδόντωσης της γραμμής του συσσωρευογραφήματος, ο πειραματιστής μπορεί να έχει μια άμεση εικόνα του μεγέθους των θρόμβων μέσω ενός παραθύρου που είναι ενσωματωμένο στην σχισμή του οργάνου και βλέπει ακριβώς στο εσωτερικό της κυψελίδας.

Οι μεγαλύτεροι λευκοί θρόμβοι είναι ορατοί δια γυμνού οφθαλμού ενώ οι μικρότεροι χρειάζονται την χρήση του στερεοσκοπίου ή του μικροσκοπίου για να υπολογιστεί η μέση τους διάμετρος και οι αριθμοί των αιμοπεταλίων που περιέχουν, υπό τον όρο ότι δεν έχει ακόμη συμβεί η τήξη των μεμβρανών τους.

Οι λευκοί θρόμβοι του συσσωρευομέτρου μπορούν να μονιμοποιηθούν σε φορμαλδεΰδη ή γλουταραλδεΰδη ώστε να μελετηθούν στις βαθύτερες λεπτομέρειές τους στο οπτικό ή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αντιστοίχως.

ε) Μεταβολές της εικόνας των συσσωρευογραφημάτων κατόπιν της χρήσης αναστολέων της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Όταν χορηγούμε μια ουσία η οποία έχει ιδιότητες αναστολέα της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, η δράση της αντικατοπτρίζεται άμεσα στα χαρακτηριστικά του συσσωρευογραφήματος των αιμοπεταλίων.

Οι μεταβολές των χαρακτηριστικών αυτών είναι, επί τροχάδην, οι ακόλουθες:

1^ο) Αν η ουσία τεθεί σε μικρές ποσότητες που δεν επαρκούν να επιφέρουν πλήρη αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, τότε το κύμα της συσσώρευσης είναι πιο χαμηλό από το κύμα συσσώρευσης ελέγχου.

Η προσθήκη ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας αναστολέα επιφέρει ακόμη μεγαλύτερη πτώση του ύψους του συσσωρευογραφήματος. Τέλος αν αυξήσουμε την προσθήκη της ουσίας πέραν ενός ορίου, κάποια στιγμή η χορήγηση του αγωνιστή δεν θα προκαλεί καθόλου συσσώρευση.

Η συγκέντρωση αναστολέα η οποία προκαλεί μείωση του ύψους της συσσώρευσης κατά 50 % ονομάζεται «συγκέντρωση ημιαναστολής» (Inhibiting Concentration 50 % ή συντομογραφικά IC₅₀). Η ελάχιστη δόση που προκαλεί πλήρη αναστολή (αναστολή 100 %) της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ονομάζεται Ελάχιστη Συγκέντρωση Πλήρους Αναστολής (Minimal Inhibiting Concentration 100 % ή συντομογραφικά MIC_{100%}).

Η αύξηση της συγκέντρωσης ενός αιμοπεταλιακού αναστολέα πέραν της ελάχιστης συγκέντρωσης αυτού που προκαλεί 100 % αναστολή δεν έχει έννοια να προστίθεται, εκτός αν η κατανάλωσή της στο διάλυμα επαναφέρει την αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα.

Στον εν λόγω τύπο δοκιμής, ο προς μελέτη αναστολέας χορηγείται στο PRP ένα μικρό χρονικό διάστημα πριν την χορήγηση του αγωνιστή. Φυσικά υπάρχουν ποικίλες παραλλαγές της χορήγησης του αναστολέα. Π.χ. μπορεί να χορηγηθεί σε μεγαλύτερη χρονική απόσταση από την στιγμή χορήγησης του αγωνιστή ή τα αιμοπετάλια να επωαστούν επί μακρόν με διάφορες συγκεντρώσεις αυτού.

Επίσης ο αναστολέας μπορεί να χορηγηθεί και ως εξής:

- I) Ταυτοχρόνως με τον αγωνιστή.
- II) Αμέσως μετά τον αγωνιστή.
- III) Στο μέσον του 1^{ου} κύματος συσσώρευσης.
- IV) Στο σημείο μεταξύ 1^{ου} και 2^{ου} κύματος συσσώρευσης.
- V) Την στιγμή που το κύμα ανέρχεται στο υψηλότερο σημείο συσσώρευσης πριν την έναρξη του οροπεδίου.
- VI) Μετά την επίτευξη του οροπεδίου (σε διαφορετικούς χρόνους από 1 έως 30 min), για την περίπτωση ελέγχου της ενδεχόμενης θρομβολυτικής ικανότητας μιας ουσίας.

2^ο) Άλλου τύπου μεταβολές με χαρακτήρα αναστολής είναι οι εξής:

α) Υπάρχουν συσσωρευογραφήματα ενός χαρακτηριστικού τύπου στα οποία η συσσώρευση καθυστερεί μεν αλλά τελικά επιτυγχάνεται. Συνεπώς εδώ ο χρόνος μέσα στον οποίο επιτελείται επιμηκύνεται πάρα πολύ. Η μείωση της γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ της εφαπτομένης και της γραμμής συσσώρευσης στην εκθετική φάση αυτής, αποτελεί ένα ποσοτικό στοιχείο αναστολής πολύ σημαντικό, το οποίο μπορεί να συνδυαστεί με την διάρκεια του χρόνου συσσώρευσης, παράμετρος που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δράσης ορισμένων ανασταλτικών παραγόντων. Ο εν λόγω τύπος συσσώρευσης λαμβάνει χώρα υπό την σταθερή μερική καταστολή ή επιβράδυνση της λειτουργίας ενός ενζύμου. Η αύξηση της δόσης του αναστολέα επιτυγχάνει τελικά πλήρη αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

β) Επίσης υπάρχουν συσσωρευογραφήματα στα οποία χορηγείται ένας αναστολέας που αναστέλλει μόνον ένα ενδιάμεσο βήμα της συνολικής πορείας συσσώρευσης. Συνεπώς η πορεία της συσσώρευσης θα προχωρήσει μέχρι εκείνο το σημείο, στο οποίο βρίσκεται το αποκλεισμένο βήμα και κατόπιν θα σταματήσει. Αυτή είναι η περίπτωση όλων των λεγομένων αντιστρέψιμων συσσωρεύσεων λόγω αναστολής της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των αιμοπεταλιακών κοκκίων.

Σαν παράδειγμα, η χορήγηση δι-ιωδιοξεικού οξέος σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro* ή αιμοπετάλια ανθρώπου *ex vivo* και εν

συνεχεία η ενεργοποίησή τους μέσω ενός τυπικού αγωνιστή έχει σαν αποτέλεσμα την αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξ αιτίας του εμποδισμού της αντίδρασης έκλυσης του περιεχομένου των κοκκίων, που μεγιστοποιεί την συσσώρευση και την καθιστά μη αντιστρεπτή.

γ) Η χορήγηση ενός αναστολέα μετά την επίτευξη μέγιστης συσσώρευσης (φάση του οροπεδίου) και η επίτευξη αποσυσσώρευσης των αιμοπεταλίων δηλώνει την εισαγωγή μιας θρομβολυτικής διεργασίας.

Τα παραπάνω δεδομένα χρησιμοποιούνται για την μελέτη των συσσωρευογραφημάτων και για την εκτίμηση του επιπέδου αναστολής, του αιμοπεταλιακού υποσυστήματος που θίγεται από αυτήν, όπως επίσης και της ισχύος ενός υπό μελέτη αναστολέα των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

στ) Εκτέλεση των πειραμάτων αναστολής των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων.

Μετά την προπαρασκευή των PRP και PPP, καθώς και την ρύθμιση των σημείων μηδενικής συσσώρευσης και μέγιστης συσσώρευσης χρησιμοποιούσαμε 450 μl PRP τα οποία τοποθετούσαμε εντός της κυψελίδας χωρητικότητας 500 μl, στο εσωτερικό της οποίας είχε προστεθεί μικρός πλαστικοποιημένος μαγνήτης για την ανάδευση των αιμοπεταλίων στις 1500 rpm.

Κατόπιν η κυψελίδα τοποθετούνταν στην σχισμή του οργάνου, γινόταν προσθήκη του αγωνιστή και ακολουθούσε η συσσώρευση, η διάρκεια παρακολούθησης της οποίας ήταν 15 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό ελεγχόταν η δράση των τριών αντιπροσωπευτικών αγωνιστών (ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ) των τριών ομωνύμων οδών της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Τα προκύπτοντα συσσωρευογραφήματα αποτελούσαν και τους ελέγχους των μετέπειτα δοκιμών. Κατόπιν παρασκευαζόταν 6 κυψελίδες με 450 μl PRP εκάστη, των οποίων τα στόμια καλυπτόταν με ένα στρώμα μεμβράνης πλαστικοποιημένης κυτταρίνης (parafilm), ώστε να μην εισέρχονται εις το εσωτερικό τους αιωρούμενα σωματίδια ή μικροοργανισμοί, και οι έξι αυτές κυψελίδες τοποθετούνταν σε ισάριθμα μεταλλικά φρεάτια σταθερής θερμοκρασίας 37 ° C.

Κάθε μία από τις παρασκευασθείσες κυψελίδες τοποθετούνταν στην σχισμή του συσσωρευομέτρου, προστίθονταν ο μαγνήτης, καθώς και μια δεδομένη ποσότητα ανασυσταθέντος σε φυσιολογικό ορό μικτού εκχυλίσματος. Μετά από ολιγόλεπτη επώαση χορηγούνταν ο επιλεγείς αγωνιστής και λαμβανόταν το συσσωρευογράφημα επί 15 λεπτά.

Εν συνεχεία προχωρούσαμε στην 2^η κυψελίδα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία αλλά χορηγώντας διπλάσια ποσότητα μικτού εκχυλίσματος των φυτών.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι του προσδιορισμού της ποσότητας εκχυλίσματος που έδινε 50 % αναστολής της συσσώρευσης, όπως επίσης και του προσδιορισμού της ελάχιστης ποσότητας εκχυλίσματος που προκαλούσε 100 % αναστολή.

Γινόταν επανέλεγχος της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας με τρεις εκ νέου ελέγχους της συσσωρευτικής ικανότητας των αιμοπεταλίων (με την προσθήκη των ιδίων βασικών αγωνιστών ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ) και εφόσον τα αιμοπετάλια ήταν πλήρως λειτουργικά, προχωρούσαμε σε νέα εξάδα δοκιμών όπου χρησιμοποιούσαμε τον δεύτερο αγωνιστή και τις ίδιες δόσεις εκχυλίσματος προκειμένου να δούμε αν υπήρχε ή όχι ισότιμη αναστολή σε συγκρίσει με τον πρώτο αγωνιστή.

Οι δοκιμές συνεχιζόταν έως ότου προσδιοριστούν η IC₅₀ και η ελάχιστη συγκέντρωση του εκχυλίσματος, που εισήγαγε πλήρη αναστολή (100%).

Μετά γινόταν επίσης επανέλεγχος της αιμοπεταλιακής λειτουργικότητας κατά τα γνωστά προαναφερθέντα και αν τα αιμοπετάλια ήσαν ξανά λειτουργικά, συνεχίζαμε την μελέτη της δράσης του εκχυλίσματος στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση που εισήγαγε ο τρίτος αγωνιστής.

Τα πειράματα αυτά επαναλαμβανόταν σε ικανό αριθμό επαναλήψεων με τα PRP του κάθε δότη (ενός κάθε φορά) ώστε να πληρώνονται οι προϋποθέσεις της στατιστικής σημαντικότητας.

Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου των πειραμάτων που αφορούσαν τους τρεις κύριους αιμοπεταλιακούς αγωνιστές που προαναφέραμε, προχωρήσαμε σε έναν νέο κύκλο πειραμάτων στον οποίο ως διεγέρτης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκαν μεγάλοι αριθμοί κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar.

Εφ' όσον οι συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων με τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα τυποποιήθηκαν, δοκιμάστηκε κατά πόσον το εκχύλισμα είναι σε θέση να αναστείλει την συσσώρευση που εισάγουν στα αιμοπετάλια τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα.

Το μοντέλο αυτό αποτέλεσε ένα μοντέλο μελέτης της αναστολής της μεταστατικής διασποράς σε εκείνη την συνιστώσα της, που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση καρκινικών κυττάρων και αιμοπεταλίων.

ζ) Χρησιμοποιηθείσες συσκευές

Για την μελέτη των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων και των δράσεων επί αυτών, του ανασυσταθέντος δια φυσιολογικού ορού, αποξηραμένου αιθανολικού εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία της εταιρίας Cronolog και συγκεκριμένα το σύστημα ηλεκτρονικής συσσωρευογραφίας Ca – 500. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τρία στοιχεία:

1^ο) Το κυρίως συσσωρευόμετρο που περιέχει το σύστημα λυχνίας λευκού φωτός – κυψελίδας – φωτοηλεκτρικού κυττάρου – εξόδου προς τον υπολογιστή και την οθόνη όπου προβάλλεται το συσσωρευογράφημα, εφ' όσον οι μεταβολές της οπτικής διαπερατότητας έχουν μετατραπεί σε ψηφιακό σήμα, ικανό να διαβαστεί από το πρόγραμμα. Αν το υπολογιστικό σύστημα αποσυνδεθεί από το βασικό συσσωρευόμετρο, μπορούμε στην έξοδό του να συνδέσουμε απλό καταγραφικό βαθμονομημένου χάρτου και να καταγράψουμε με αυτόν τον τρόπο τις αιμοπεταλιακές αντιδράσεις.

2^ο) Η μονάδα μνήμης και επεξεργασίας του ψηφιακού σήματος, η οποία έχει προγραμματιστεί να λειτουργεί σε περιβάλλον Windows 1995. Η μονάδα αποθηκεύει τα συσσωρευογραφήματα, τα οποία είναι ανακτήσιμα με διάφορους τρόπους πρόσβασης στην μνήμη (π.χ μέσω ID, ονοματεπωνύμου καθώς και ημερολογιακά). Τα δεδομένα μπορούν να αριθμοποιηθούν και να μεταφερθούν στο Excel για στατιστική και άλλη επεξεργασία.

3^ο) Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής (πλήρης), ο οποίος περιλαμβάνει την δική του μονάδα επεξεργασίας, η οποία αναλαμβάνει τον έλεγχο της μονάδας επεξεργασίας και μνήμης του συσσωρευομέτρου, και την χειρίζεται με το πρόγραμμά του, που είναι συμβατό με το πρόγραμμα της συσκευής της Cronolog. Ο υπολογιστής περιλαμβάνει οθόνη και πληκτρολόγιο. Ο

χρησιμοποιούμενος υπολογιστής είναι ένα μοντέλο της Hewlett – Packard 2000, τύπου Pentium III.

ΣΤ3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΘΡΟΜΒΟΞΑΝΗΣ A_2 (TXA₂) ΑΠΟ ΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕΣΩ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ (ADP, PAF, ΑΡΑΧΙΔΟΝΙΚΟ ΟΞΥ ΚΑΙ ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΠΙΜΥΟΣ W1STAR.

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήσαμε επίσης την μεθοδολογία της συσσωρευογραφίας των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων, αλλά όχι προς την κατεύθυνση της εύρεσης των δόσεων των εκχυλίσματος που επιφέρουν 50% και 100% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αλλά προς την κατεύθυνση της μελέτης της αναστολής της παραγωγής TXA₂ εκ μέρους εκείνης της ποσότητας εκχυλίσματος η οποία προκαλεί πλήρη (100%) αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης που εισάγουν οι αγωνιστές ADP, PAF, Αραχιδονικό Οξύ και λειομυοσαρκωματικά κύτταρα.

Γι' αυτό επαναλαμβάνουμε την διαδικασία ελέγχου της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ενός δότη, μέσω διέγερσής τους από έναν συγκεκριμένο αγωνιστή κάθε φορά, σύμφωνα με την ως άνω περιγραφείσα τεχνική.

Στη συνέχεια τοποθετούσαμε στις κυψελίδες που περιείχαν το PRP του ίδιου δότη, εκείνη την ποσότητα εκχυλίσματος που επέφερε αναστολή επιπέδου 100 % στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων όταν ως διεγέρτης χρησιμοποιούνταν ο εν λόγω αγωνιστής, τον οποίον και χορηγούσαμε στα αιμοπετάλια.

Σε όλες τις περιπτώσεις μετά την παρέλευση 5 ή 10 min από την λήξη της συσσώρευσης παραλαμβάνουμε το PRP και το τοποθετούσαμε σε ξεχωριστά συλλεκτικά κρυσταλλικά στα οποία είχαμε προηγουμένως προσθέσει 50 μl διαλύματος, τα οποία περιείχαν 5 mg ινδομεθακίνης, ώστε να αναστέλλονται οριστικά τα ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή της θρομβοξάνης (δηλαδή η αιμοπεταλιακή κυκλοξυγονάση¹).

Έτσι προέκυψαν οι εξής ομάδες φιαλιδίων PRP:

- 1^{ov}) Η ομάς I, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που δεν υπέστη συσσώρευση.

- 2^{ον}) Η ομάς II, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με ADP.
- 3^{ον}) Η ομάς III, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με PAF.
- 4^{ον}) Η ομάς IV, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με Αραχιδονικό Οξύ.
- 5^{ον}) Η ομάς V, η οποία περιείχε φιαλίδια με PRP που συσσωρεύτηκε με λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (στα τελευταία αυτά φιαλίδια, εκτός από την παραπάνω αναφερθείσα ποσότητα ινδομεθακίνης, προσθέσαμε και μια ποσότητα 5 mg ναμπουμετόνης, για την αναστολή του ενζύμου κυκλοξυγονάση 2 (COX-2), που ενδεχομένως περιέχονταν στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα).

Η συλλογή του PRP στα φιαλίδια γινόταν αμέσως μετά την παρέλευση 5 ή 10 min από την περάτωση της συσσώρευσης και κάθε φιαλίδιο παρέμεινε βυθισμένο εντός θρυμματισμένου πάγου μέχρι την λήξη του πειράματος, δηλαδή έως ότου πληρωθεί από όλο το PRP των αντίστοιχων δοκιμών.

Κατόπιν τοποθετούνταν σε καταψύκτη – 80 ° C και φυλασσόταν εκεί μέχρι την ημέρα της μετρήσεως της θρομβοξάνης.

Πριν την τοποθέτηση στην βαθιά ψύξη, στον αεροθάλαμο του φιαλιδίου γινόταν εμφύσηση του ευγενούς αερίου αργού και κατόπιν επιμελής αεροστεγής σφράγιση, ώστε να μην διαφύγει το αδρανές αέριο.

Τα παρασκευασθέντα με αυτό το τρόπο δείγματα παρέμειναν στην βαθιά ψύξη το πολύ για 30 ημέρες και ύστερα χρησιμοποιήθηκαν για τους προσδιορισμούς της θρομβοξάνης A₂.

α) Εκχύλιση και προσδιορισμός της θρομβοξάνης A₂

Η εκχύλιση και ο προσδιορισμός των ολικών θρομβοξανίων (και όχι μόνον της θρομβοξάνης A₂) έγινε με την ακόλουθη μεθοδολογία:

Τα φιαλίδια που περιείχαν το PRP που συλλέχθηκε, όπως περιγράψαμε, εξήχθησαν από την βαθιά ψύξη και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για να αποψυχθούν και να ισορροπήσουν θερμικά επί ένα ημίωρο.

Κατόπιν το περιεχόμενο του κάθε φιαλιδίου, αναμίχθηκε επιμελώς με αναδευτήρα δόνησης (vortex) ώστε να ομογενοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο και να διασπαστούν οι θρόμβοι. Στη συνέχεια όλα τα φιαλίδια τέθηκαν σε θερμοστατούμενη φυγόκεντρο και φυγοκεντρήθηκαν επί 5 min στις 3000 rpm και σε θερμοκρασία 0° C.

Για την εκχύλιση των αιμοπεταλιακών λιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες στήλες (Amprap ethyl C2 microcolumns), οι οποίες αφού τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη διάταξη, ώστε να επιτρέπουν την διέλευση υγρών κατά μήκος τους και με την δύναμη της βαρύτητας, ενεργοποιήθηκαν μέσω έκπλυσής τους με μεθανόλη και εν συνεχεία δισαππεσταγμένο νερό.

Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την εκχύλιση των λιπιδίων έχει αναλυτικώς ως εξής:

1. Έκπλυση κάθε στήλης με 2 cm³ μεθανόλης και κατόπιν με 4 cm³ δισαππεσταγμένου νερού.
2. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 rpm για 5 min σε ψυκτική – θερμοστατούμενη φυγόκεντρο στους 0° C.
3. Λήψη μιας ποσότητας 400 μl από το υπερκείμενο του φυγοκεντρηθέντος δείγματος και οξίνισή του με 25 μl αραιού υδροχλωρικού οξέος.
4. Αραίωση του οξινομένου δείγματος με 4 όγκους δισαππεσταγμένου νερού.
5. Τοποθέτηση του τελικού αυτού αραιωμένου δείγματος στην στήλη, ασκώντας μια ελαφρά πίεση ώστε να υπάρχει μια ροή περίπου 0,5 cm³ / min.
6. Έκπλυση της στήλης με 3 cm³ δισαππεσταγμένο νερό και απόρριψη του εκπλύματος.
7. Έκπλυση της στήλης με 3 cm³ αιθανόλης 10% και απόρριψη του εκπλύματος.
8. Έκπλυση της στήλης με 3 cm³ cm³ δισαππεσταγμένο νερό και απόρριψη του εκπλύματος.
9. Έκπλυση της στήλης με 3 cm³ κανονικού εξανίου και απόρριψη του εκπλύματος.

10. Εφαρμογή 5 cm³ οξικού αιθυλίου (ethyl acetate) στην στήλη και παραλαβή του εκπλύματος σε μεγάλο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.
11. Ξήρανση του εκχυλίσματος με ρεύμα αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου και φύλαξη των στεγνωμένων σωληναρίων στον καταψύκτη (- 20° C).

Μετά την ανασύσταση και την επεξεργασία με τα εξειδικευμένα αντισώματα του kit μετρήθηκε η ραδιενέργεια σε γ – κάμερα και το αποτέλεσμα εξήχθη σε pg TXB₂ / ml της οποίας το ποσό αντιπροσωπεύει και την TXA₂.

Z. ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝΤΟΣ ΔΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΟΡΟΥ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΕΠΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΦΟΝΙΚΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (NKCs) ΑΝΘΡΩΠΩΝ.

Z(1). Μεθοδολογία των πειραμάτων - Απομόνωση Έλεγχος λειτουργικότητας (κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων).

Στα εν λόγω πειράματα μελετήθηκε η δράση του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* + *Abies alba* επί της κυτταροτοξικής ικανότητας φονικών λεμφοκυττάρων ανθρώπου (NKCs) ενάντια σε καρκινικά κύτταρα ερυθρολευχαιμίας ανθρώπου της σειράς K-562 και σε καρκινικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar. Τα πειράματα υπολογισμού των μεταβολών της κυτταροτοξικότητας έγιναν με την μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής. Παρακάτω περιγράφουμε επί τροχάδην τις κύριες μεθόδους που ακολουθήσαμε για την απομόνωση και καλλιέργεια τους, όπως επίσης και τα σχετικά με την μελέτη της λειτουργικότητάς τους.

α) Απομόνωση Φυσικών Φονικών Λεμφοκυττάρων από ολικό ανθρώπινο αίμα.

Η απομόνωση των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων από το ολικό αίμα του ανθρώπου βασίζεται στη ανοσολογική μέθοδο του ρόδακος (rosettesep).

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μια σύντομη επώαση του δείγματος με ένα παρασκεύασμα το οποίο περιλαμβάνει μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας. Τα αντισώματα αυτά προσκολλώνται επί της επιφάνειας των κυττάρων του αίματος τα οποία θέλουμε να αποκλείσουμε, προκειμένου να συλλέξουμε τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα. Όταν τα αντισώματα προσκολληθούν επί των μεμβρανών, των προς αποκλεισμό λευκοκυττάρων, τότε αυτά σχηματίζουν ανοσολογικούς ρόδακες με τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Οι εν λόγω ρόδακες εξ αιτίας του μεγάλου τους βάρους (καθόσον αποτελούν συσσωματώματα πολλών κυττάρων) κατακρημνίζονται προς τον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα μέσω μιας απλής φυγοκέντρησης, διαπερνώντας ένα στρώμα φικόλης, το οποίο έχει επιμελώς τοποθετηθεί στον ενδιάμεσο χώρο του δοκιμαστικού σωλήνα πριν την εισαγωγή σε αυτόν του δείγματος αίματος που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Τα NKCs, τα οποία δεν συνδέονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα, λόγω της μικρής τους πυκνότητας διασπείρονται σε μια ζώνη μεταξύ του πλάσματος και της φικόλης, συλλεγόμενα κατόπιν μέσω μιας πιπέτας.

Τα απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια για την απομόνωση των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων έχουν ως ακολούθως:

- 1) Φιαλίδια με EDTA για αιμοληψία και συλλογή.
- 2). Διάλυμα αντισωμάτων (tac cocktail) το οποίο περιλαμβάνει μονοκλωνικά αντισώματα για τα ακόλουθα αντιγόνα επιφανείας: CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b). Το διάλυμα αυτό αποτελεί το κρισιμότερο αντιδραστήριο του πρωτοκόλλου
- 3) Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum ή FBS).
- 4) Phosphate buffered Saline (PBS) χωρίς Ca ή Mg.
- 5) Φικόλη.
- 6) Πιπέτες.
- 7) Φυγόκεντρος.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση έχει ως εξής:

- 1) Προσθήκη 50 μl διαλύματος αντισωμάτων (tac cocktail) ανά ml ολικού αίματος και αμέσως καλή ανάδευση.
- 2) Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Αραίωση του δείγματος με ίσο όγκο PBS + 2 % FBS και αμέσως ανάδευση.
- 4) Τοποθέτηση φικόλης κάτω από την ζώνη του αραιωμένου διαλύματος με προσοχή χωρίς να αναμιχθεί με το δείγμα.
- 5) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 1200 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
- 6) Απομόνωση των φυσικών φονέων από την ζώνη της φικόλης και του πλάσματος.
- 7) Έκπλυση των φυσικών φονικών λευκοκυττάρων με PBS + 2 % FBS.

β) Η καλλιέργεια των Φυσικών Φονικών Λεμφοκυττάρων .

Η καλλιέργεια των φυσικών φονέων γίνεται σε μέσον μεθυλιωμένης κυτταρίνης (methylcellulose media). Η χρησιμοποίηση αυτού του μέσου μεγιστοποιεί την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων, ενώ η αύξηση του ιζώδους του μέσου, δια της χρησιμοποίησης ενός κατάλληλου παράγοντα, κάνει τις αποικίες των κυττάρων πλέον ευδιάκριτες και εύκολα μετρήσιμες.

Η επιμελής καλλιέργεια των φυσικών φονέων και η συντήρηση των κυτταρικών τους σειρών απαιτούν τον ακόλουθο εργαστηριακό εξοπλισμό: Θάλαμο βιολογικής ασφάλειας, επωαστικό κλίβανο CO₂, ανάστροφο μικροσκόπιο, πιπέτες, αυτόματο μετρητή κυττάρων.

Απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια είναι: τρυβλία Petri, χρώση Trypan blue, 3% οξικό οξύ με κυανό του μεθυλενίου, μεθυλιωμένη κυτταρίνη σε κυτταροκαλλιεργητικό μέσον Iscoves.

Η διαδικασία καλλιέργειας των φυσικών φονέων είναι η ακόλουθη:

- 1) Τα αποστειρωμένα δοχεία Petri των 35 mm προσημειώνονται για διπλά δείγματα.

- 2) Τα σωληνάρια μεθυλιωμένης κυτταρίνης λαμβάνονται από την κατάψυξη και έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου κατά την διάρκεια της νύχτας. Αν είναι απαραίτητο, αναδεύονται για να αναμιχθούν όλα τα συστατικά. Ο ολικός όγκος πρέπει να είναι 3 ml, αλλιώς προστίθεται και άλλο υλικό.
- 3) Προετοιμασία 10x κυττάρων σε καλλιεργητικό μέσον Iscoves περιέχοντος 2 % FBS.
- 4) Ακριβής μεταφορά 0,3 ml κυττάρων σε 3 ml μεθυλιωμένης κυτταρίνης.
- 5) Ανάδευση των σωληναρίων.
- 6) Δύο με τρία λεπτά παραμονή σε ηρεμία για να διαλυθούν οι φυσαλίδες που πιθανόν να εμφανιστούν στην επιφάνεια.
- 7) Μεταφορά σε κάθε τρυβλίο Petri μιας ποσότητας 1,1 ml μεθυλιωμένης κυτταρίνης, η οποία περιέχει τα λεμφοκύτταρα, με πλαστική αποστειρωμένη σύριγγα των 3 ml, από την οποία έχει αφαιρεθεί η βελόνα.
- 8) Κατανομή και επάλειψη του υλικού σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου Petri, με απαλές κινήσεις.
- 9) Τοποθέτηση των 2 τρυβλίων Petri, σε ένα μεγαλύτερο (των 100 mm). Ταυτόχρονα προστίθεται ένα τρίτο τρυβλίο Petri (διαμέτρου 35 mm) που περιέχει δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, ενώ ακολουθεί απομάκρυνση του καπακιού, του μεγάλου συγκεντρωτικού τρυβλίου Petri (των 100 mm διαμέτρου) και αντικατάστασή του με άλλο αποστειρωμένο καπάκι για την αποφυγή τυχούσας μόλυνσης .
 Η χρησιμοποίηση του τρυβλίου Petri των 100 mm γίνεται για διατήρηση υγρασίας και ελαχιστοποίηση των επιμολύνσεων κατά τη διάρκεια χειρισμού των αποικιών.
 Οι χειρισμοί αυτοί πρέπει να γίνονται στο εσωτερικό αποστειρωμένης τράπεζας κυτταρικής σποράς, εφοδιασμένης με αντιμικροβιακά φίλτρα νηματικής ροής (laminar flow) και λυχνίες υπεριώδους.
 Επίσης πρέπει όλοι οι χειρισμοί να γίνονται στο εσωτερικό του θαλάμου βιολογικής ασφάλειας (αποστειρωμένο δωμάτιο, με ακτινοβολία UV και πρόσβαση ειδικά ενδεδυμένου προσωπικού, ώστε τα εισερχόμενα μικροβιακά φορτία να εκμηδενίζονται ταχέως).
- 10) Τελικό στάδιο είναι η τοποθέτηση των τρυβλίων, των φερόντων τις αποικίες των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων, σε κλίβανο ρυθμιζόμενης ατμόσφαιρας περιέχουσας 5 % CO₂, 95 % O₂ και >95 % υγρασία.

Οι κατάλληλες συνθήκες είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την διασφάλιση καλλιέργειας κυττάρων με υψηλές προδιαγραφές.

γ) Έλεγχος της λειτουργικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων

Η λειτουργικότητα των φυσικών φονέων (η κυτταροτοξικότητά τους απέναντι στα καρκινικά κύτταρα, ως στόχοι) ελέγχεται με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων έναντι συγκεκριμένων κυττάρων - στόχων.

Πρέπει, στο σημείο αυτό, να σημειωθεί ότι η κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων ενδεχομένως να μην είναι ένα φαινόμενο συμπαγές και αδιαφοροποίητο, αλλά να εμφανίζει κάποιες εκλεκτικότητες απέναντι σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων – στόχων.

Μέσα στους τύπους κυττάρων – στόχων συμπεριλαμβάνονται κακοήθη κύτταρα του οργανισμού, μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί). Τα NKC's έχουν το εντυπωσιακό ανοσολογικό χαρακτηριστικό να αναγνωρίζουν τα επικίνδυνα κύτταρα και ιούς και να τα φονεύουν χωρίς την αναγκαστική παρεμβολή της σήμανσής τους με αντισώματα.

Ειδικά για την περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, φαίνεται ότι η εκκαθάρισή τους είναι μια διαρκής ανοσολογική λειτουργία, καθότι η πραγματοποίηση κακοηθών εξαλλαγών σε αρκετά σωματικά κύτταρα και συνεπώς η μετατροπή τους σε καρκινικά, είναι ένα φαινόμενο διαρκούς παρουσίας στο ανθρώπινο σώμα, όπως και στο σώμα των ανωτέρων ζώων, τα οποία είναι καλύτερα μελετημένα.

Η τάση παραγωγής καρκινικών κυττάρων, υπό συνθήκες διατροφικής και ανοσολογικής σταθερότητας και απουσία εργασιακών και ψυχικών καταπονήσεων, αυξάνει από την εισαγωγή στο σώμα μεγαλύτερων ποσοτήτων περιβαλλοντικών καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων παραγόντων, από την αύξηση της έκθεσης στις ιοντίζουσες ακτινοβολίες, από την έκθεση σε ογκογόνους ιούς, όπως επίσης και από την αύξηση της ηλικίας, δηλαδή την γήρανση του οργανισμού.

Αυτές οι επιβαρύνσεις είναι πολύ μεγάλες στην εποχή μας, όπως επίσης και οι καταπονήσεις της καθημερινότητας. Συνεπώς είναι εύλογο να αναμένουμε μια πτώση και των αντοχών του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συνεπώς η μελέτη των παραμέτρων που προσδιορίζουν την ισχυροποίηση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικότερα εκείνου του τμήματός του που περιλαμβάνει τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα, θα μπορούσε να αποβεί πολύ χρήσιμη τόσο ως προφυλακτικός παράγοντας κατά του καρκίνου, όσο και ως θεραπευτικός παράγοντας.

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα δεν λειτουργούν φυσιολογικά στα άτομα που πάσχουν από καρκίνο. Συνεπώς ο έλεγχος της λειτουργικότητας των εν λόγω κυττάρων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για την εκλογίκευση της πρόληψης και των θεραπειών.

Για να μελετήσουμε τις λειτουργικές αντιδράσεις των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων το εργαλείο επιλογής είναι σήμερα η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής.

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ικανότητα να διαφοροποιηθούν τα δραστικά κύτταρα (effectors) από τους στόχους (targets) που είναι κυτταρικοί πληθυσμοί. Αυτό γίνεται με την χρησιμοποίηση της κυτταρικής σειράς K-562 και κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar, που παίζουν τον ρόλο κυττάρων-στόχων, τα οποία βάφονται με πράσινο φθοριόχρωμα.

Αυτή η χρώση παραμένει στην μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, έτσι ώστε να επιτρέπει ένα καθαρό οπτικό διαχωρισμό ανάμεσα στα δραστικά κύτταρα και τα κύτταρα-στόχους. Μετά την επώαση των δραστικών κυττάρων (φυσικοί φονείς και NKT κύτταρα) με τα κύτταρα-στόχους, ένα κόκκινο φθοριόχρωμα DNA προστίθεται για να σημάνει τα κύτταρα-στόχους που επηρεάστηκαν από την δραστηριότητα των φυσικών φονέων. Αυτή η χρώση επισυνάπτεται μόνο σε κύτταρα με συμβιβαστικές πλασματικές μεμβράνες.

Με αυτό τον τρόπο, ένας καθαρός διαχωρισμός μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ τεσσάρων κυτταρικών «τύπων»: ζωντανά κύτταρα-στόχοι, νεκρά κύτταρα-στόχοι, ζωντανά δραστικά κύτταρα και νεκρά δραστικά κύτταρα. Έτσι μπορεί να εξακριβωθεί η ακριβής αντιστοιχία ανάμεσα στα δραστικά και στα κύτταρα-στόχους.

Απαραίτητος εξοπλισμός είναι: πιπέτες, υδατόλουτρο, CO₂ κλίβανος, ψηφιακό θερμόμετρο, αναδευτήρας vortex, αιματοκυτταρόμετρο, φυγόκεντρος, κυτταρομετρητής ροής με μήκος κύματος 488 nm. Το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Orpregon, Germany.

Απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια είναι τα ακόλουθα: δοκιμαστικοί σωλήνες των 15, 50 ml και 12x75 mm, αποστειρωμένες πιπέτες των 1, 5, 10 ml, σωληνάρια συλλογής αίματος με EDTA, φικόλη, PBS, φιαλίδια με κύτταρα σειράς K-562, κύτταρα από λειομυοσαρκώματα επίμυων Wistar (κύτταρα-στόχοι), φιαλίδια που περιέχουν ιντερλευκίνη-2, μπουκάλια με complete medium, μπουκάλι με διάλυμα χρώσης DNA.

Η διαδικασία μέτρησης την κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονέων είναι η ακόλουθη:

- 1** Προετοιμασίες.
 - 1.1** Ετοιμασία υδατόλουτρου στους 37° C.
 - 1.2** Τοποθέτηση complete medium στο υδατόλουτρο.
 - 1.3** Προετοιμασία πάγου για τοποθέτηση δειγμάτων μέχρι τις μετρήσεις.
 - 1.4** Άνοιγμα και καλιμπράρισμα του κυτταρομετρητή ροής.
- 2** Απομόνωση των δραστικών κυττάρων (effector cells).
Συλλογή 5 ml αίματος από υγιή άτομα που θα ελεγχθούν για λειτουργικότητα των φυσικών φονέων.
 - 2.1** Τοποθέτηση 5 ml φικόλης σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml. Αραίωση δείγματος αίματος σε αντιστοιχία 1 : 2 με PBS. Προσεκτική τοποθέτηση αραιωμένου αίματος στην ζώνη της φικόλης.
 - 2.2** Φυγογέντρωση για 20 λεπτά σε 700 x g, σε θερμοκρασία δωματίου.
 - 2.3** Απομόνωση της άνω ζώνης και συλλογή της ζώνης που περιέχει τα μονοπύρρηνα κύτταρα. Μεταφορά των παραπάνω κυττάρων σε δοκιμαστικό σωλήνα, πρόσθεση 12 ml PBS και ανάδευση.
 - 2.4** Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 250 x g . Άδειασμα του υπερκείμενου χωρίς να πειραχθεί ο κυτταρικός σβώλος.
 - 2.5** Τοποθέτηση στον κυτταρικό σβώλο 1 ml complete medium, προσδιορισμός κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο και ρύθμιση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε 5 x 10⁶ κύτταρα ανά ml σε complete medium.

- 3.1** Τοποθέτηση των K-562 κυττάρων-στόχων σε υδατόλουτρο στους 37 ° C.
- 3.2** Τοποθέτηση 50 ml complete medium σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml.
- 3.3** Μεταφορά των κυττάρων-στόχων στον δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει τα 50 ml complete medium και ανάδευση.
- 3.4** Φυγοκέντρηση σε 120 x g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 3.5** Τοποθέτηση 1 ml complete medium στον κυτταρικό σβώλο. Προσδιορισμός κυττάρων και ρύθμιση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε 1×10^5 / ml σε complete medium.
- 4** Τεστ κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρητή ροής.
Τα δραστικά κύτταρα (E) αναμιγνύονται με τα K-562 κύτταρα-στόχους (T) σε αναλογίες 50:1, 25:1, 12,5:1 (Πίνακας 1). Τα δραστικά κύτταρα επωάζονται σε τελικό όγκο 200 μl.
- 4.1** Ανάδευση όλων των σωληναρίων και φυγοκέντρηση σε 120 x g για 2-3 λεπτά.
- 4.2** Επώαση των σωληναρίων για 120 λεπτά σε CO₂ κλίβανο σε 37° C.
- 4.3** Πρόσθεση 50 μl DNA χρώσης ανά σωληνάριο, ανάδευση και επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Μέτρηση σε διάστημα 30 λεπτών μετά από την πρόσθεση της χρώσης DNA.
- 5** Ανάλυση αποτελεσμάτων από κυτταρομετρητή ροής.

Πίνακας 1: Αναλογίες όγκων για έλεγχο (control) και δείγματα.

E:T	E κύτταρα (μl)	T κύτταρα-στόχοι (μl)	complete medium (μl)
50:1	100	100	0
25:1	50	100	50
12,5:1	25	100	75
Έλεγχος	0	100	100

Χρησιμοποίηση του control δείγματος και σε κάθε δείγμα γίνεται αξιολόγηση της αναλογίας E:T επί τοις εκατό (%).

Δύο κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων: ο FACScan και ο Erics XL-MCL της εταιρείας Becton Dickinson.

Τα ιστογράμματα που χρησιμοποιήθηκαν με τους δύο κυτταρομετρητές ροής για την ανάλυση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων κατασκευάστηκαν από τους τεχνικούς υποστήριξης των συσκευών και τον υπεύθυνο Βιολόγο που πραγματοποίησε τις μετρήσεις.

Η. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΝΟΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ 5 – ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ, ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΣ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΑΠΟΞΗΡΑΝΘΕΤΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba*.

α) Γενικά

Η λιποξυγονάση και η κυκλοξυγονάση αποτελούν δύο σημαντικά ένζυμα της οδού του αραχιδονικού οξέος.

Τα δύο αυτά ένζυμα είναι πολύ σημαντικά για την παραγωγή της σειράς των προσταγλανδινών και των λευκοτριενίων αντιστοίχως.

Οι δύο αυτές σειρές λιποειδών προκύπτουν από την εκλεκτική υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος και την αρχική παραγωγή αραχιδονικών υδροϋπεροξειδίων, τα οποία υφίστανται την δράση και άλλων ενζύμων προκειμένου να καταλήξουν στα ενεργά προϊόντα κάθε κλάδου της αραχιδονικής οδού, δηλαδή του κλάδου της κυκλοξυγονάσης και του κλάδου της λιποξυγονάσης.

Τόσο οι προσταγλανδίνες όσο και τα λευκοτριένια συνεισφέρουν σημαντικά στην πυροδότηση και την εξέλιξη της αντίδρασης της φλεγμονής, όπως αναλυτικώς περιγράψαμε στο γενικό μέρος (Κεφ. 1).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε αναλυτικά η αντίδραση της 5-λιποξυγονάσης, διότι ήδη από την δράση του μικτού εκχυλίσματος στα αιμοπετάλια είχε εξαχθεί το δεδομένο ότι το εκχύλισμα ανέστειλε την αιμοπεταλιακή συσσώρευση, καθόσον μείωνε δοσοεξαρτώμενα την παραγωγή της θρομβοξάνης A₂.

Αυτό σήμαινε ότι το εκχύλισμα ανέστειλε ισχυρά την κυκλοξυγονάση και συνεπώς – δυνητικά – λειτουργούσε και ως αντιφλεγμονώδης

παράγοντας. Ίσως οι συνολικές και πολυεπίπεδες δράσεις του εν λόγω μικτού εκχυλίσματος, συμπεριλαμβανομένης και της αντικαρκινικής του δράσης, να οφείλονται κατά βάση στις αντιφλεγμονώδεις του ιδιότητες.

Δεδομένου ότι στην εποχή μας λαμβάνει χώρα μια ιδιαίτερος εντατική έρευνα για την ανάπτυξη νέων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων με αντικαρκινικές ιδιότητες, εφ' όσον είχαμε το δεδομένο της αναστολής της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης, μελετήσαμε και το κατά πόσον το εκχύλισμα ήταν σε θέση να αναστείλει και την λιποξυγονάση και συνεπώς να ασκήσει μια γενική κατασταλτική δράση στην αραχιδονική οδό και την φλεγμονή.

Για τον λόγο αυτό μελετήσαμε τις δράσεις του αποξηρανθέντος αιθανολικού εκχυλίσματος και ανασυσταθέντος δια φυσιολογικού ορού επί της αντίδρασης υπεροξειδωσής του λινολεϊκού οξέος από το ένζυμο 5 – λιποξυγονάση, όπως περιγράφουμε αναλυτικά κατωτέρω.

β) Περιγραφή του πρωτοκόλλου

Για την *in vitro* αναπαραγωγή της αντίδρασης της 5 – λιποξυγονάσης χρησιμοποιήθηκε ένα παρασκεύασμα αυτής προερχόμενο από σόγια και διατιθέμενο από την εταιρεία Sigma. Το παρασκεύασμα αυτό περιέχει συνολικά 1,6 g υλικού, το οποίο, ωστόσο, δεν είναι καθαρή λιποξυγονάση, αλλά περιέχει προσμίξεις.

Βάσει του συνοδευτικού πληροφοριακού φυλλαδίου, 1 mg του παρασκευάσματος αυτού περιέχει 48.000 μονάδες λιποξυγονάσης, ενώ 1 mg καθαρής λιποξυγονάσης ισοδυναμεί με 63.000 μονάδες του εν λόγω ενζύμου.

Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας της λιποξυγονάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου, η οποία, αν τεθεί σε διάλυμα αντίδρασης όγκου 3 ml, με υπόστρωμα το λινολεϊκό οξύ, προκαλεί μια αύξηση της οπτικής απορρόφησης A στα 234 nm ίση προς 0,001 ανά λεπτό, σε pH = 9 και θερμοκρασία ίση προς 25 ° C. Συνεπώς, κατά την διάρκεια διεξαγωγής των δοκιμών τα διαλύματα με τα οποία εργαζόμαστε πρέπει να έχουν θερμοκρασία ίση προς 25 ° C. Αντιθέτως το διάλυμα του ενζύμου πρέπει να διατηρείται κατά την διάρκεια των δοκιμών στους 0° C, δηλαδή βυθισμένο σε θρύμματα πάγου, σε παγόλουτρο.

Αυτό είναι πολύ σημαντικό διότι η λιποξυγονάση είναι ένα ένζυμο το οποίο αυτοκαταστρέφεται όταν ενεργοποιείται και η διατήρησή του σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι αποφασιστικής σημασίας για την επιμήκυνση του χρόνου ημιζωής του. Η όλη διαδικασία της εκτίμησης της δραστηριότητας του εν λόγω ενζύμου έχει ως εξής:

A. Απαραίτητα αντιδραστήρια

1) Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος ή αντιδραστήριο A.

Η συγκέντρωση του βορικού οξέος είναι ίση προς 0,2 M και το pH = 9. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται ως εξής: Χρησιμοποιώντας απολύτως καθαρά σκεύη ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας (αναλυτικού βαθμού) 6,18 g βορικού οξέος και τα διαλύουμε σε ποσότητα 300 ml δισαππεσταγμένου νερού, στο εσωτερικό ογκομετρικής φιάλης. Διορθώνω το pH του διαλύματος στο 8 μέσω της προσθήκης NaOH (50 %) με προσεκτική και ταυτόχρονη ανάδευση. Κατόπιν, εφ' όσον το διάλυμα ισορροπήσει ανεβάζω το pH στο 9. Ανεβάζω σταδιακά την στάθμη του όλου διαλύματος με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων δισαππεσταγμένου νερού και ελέγχοντας διαρκώς το pH ώστε να παραμένει στο 9, μέχρι του τελικού όγκου των 500 ml.

2) Διάλυμα υποστρώματος (Αντιδραστήριο B).

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, τοποθετώ 0,05 ml λινολεϊκού οξέος (Sigma cod. no. L – 1376). Προσθέτω 0,05 ml αμετουσίωτης αιθανόλης (95 %). Αναμιγνύω ήπια ώστε να σχηματισθεί γαλάκτωμα και κάτω από σταθερή και αργή ανάδευση προσθέτω με πολύ βραδύ ρυθμό, νερό μέχρις ότου ο όγκος του γαλακτώματος γίνει ίσος προς 50 ml. Το διάλυμα αυτό είναι το μητρικό διάλυμα υποστρώματος ή αντιδραστήριο B. Για κάθε σειρά δοκιμών διαλύω 5 ml του διαλύματος αυτού με 30 ml αντιδραστηρίου A. Αυτό είναι το διάλυμα εργασίας για το υπόστρωμα (λινολεϊκό οξύ).

3) Διάλυμα του ενζύμου.

Παρασκευάζω ένα διάλυμα που περιέχει 10.000 μονάδες ενζύμου ανά ml ψυχρού αντιδραστηρίου (θερμοκρασία εργασίας 0 ° C). Για κάθε δοκιμή

χρησιμοποιώ μια ποσότητα διαλύματος που περιέχει 500 μονάδες ενζύμου ανά 3 ml αντιδρώντος μίγματος (αντιδραστήριο C).

B) Διαδικασία μέτρησης λιποξυγονασικής δραστηριότητας.

Σε δύο κυψελίδες από χαλαζία (χρησιμοποιούνται διότι η μέτρηση γίνεται στο υπεριώδες) με οπτικό βήμα 1 cm, θέτω ετικέτες «blank» και «test» και πιπετάρω σε κάθε μια αυτές τα εξής:

Κυψελίδα Blank:

Αντιδραστήριο A: 1 ml
 Διάλυμα υποστρώματος: 2 ml
 Διάλυμα ενζύμου (αντ .C): 0 ml
 Ολικός όγκος: 3 ml

Κυψελίδα Test

Αντιδραστήριο A: 0,95 ml
 Διάλυμα υποστρώματος: 2 ml
 Διάλυμα ενζύμου: 0,05 ml
 Ολικός όγκος: 3 ml

Αφού προσθέσω και το αντιδραστήριο που περιέχει το ένζυμο (αντιδραστήριο C), αναμιγνύω καλά και γρήγορα και τοποθετώ την κυψελίδα στην σχισμή ενός κατάλληλου φασματοφωτομέτρου (που έχω αφήσει να προθερμανθεί τουλάχιστον για 2 ώρες), καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης A στα 234 nm ως προς το blank.

Ο ρυθμός της αύξησης είναι συνήθως μέγιστος μεταξύ 1 και 3 min, ενώ κατόπιν αρχίζει να μειώνεται. Προσδιορίζω την μέγιστη ΔA_{234} , ανά λεπτό, μεταξύ 1^{ου} και 3^{ου} λεπτού και χρησιμοποιώ την τιμή αυτή για να υπολογίσω την μέγιστη ειδική δραστηριότητα.

i) Υπολογισμοί

$\Delta A_{234} / \text{min} : 0,001X \text{ mg ενζύμου} / 3 \text{ ml (όγκος αντιδρώντων)} = \text{Μονάδες} / \text{mg ενζύμου}.$

ii) Ορισμός μονάδας

Μια μονάδα λιποξυγονάσης προκαλεί αύξηση της A_{234} ίσης προς 0,001 ανά λεπτό σε pH = 9 και θερμοκρασία ίση προς 25 ° C, όταν χρησιμοποιούμε ως υπόστρωμα το λινολεϊκό οξύ. Ο αντιδρών όγκος είναι ίσος προς 3 ml.

iii) Εκτέλεση

Η διαδικασία της μέτρησης έμεινε σταθερή όπως περιγράφεται παραπάνω, με την διαφορά της προσθήκης ποσοτήτων μικτού εκχυλίσματος (ξηρανθέντος και ανασυσταθέντος με φυσιολογικό ορό) στην κυψελίδα του test, διορθώνοντας ταυτοχρόνως τους όγκους των blank ώστε οι τελικοί όγκοι να είναι πάντοτε ίσοι στις συγκρινόμενες δοκιμασίες.

iv) Παρατηρήσεις

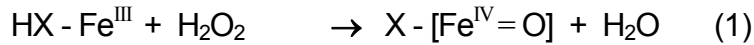
Η αιθανόλη έχει σταθερά χρησιμοποιηθεί ως διαλυτικό μέσον του λινολεϊκού οξέος – που αντιπροσωπεύει και το υπόστρωμα της 5 – λιποξυγονάσης – φθάνοντας σε μια τελική συγκέντρωση ίση με το 10% του τελικού αντιδρώντος όγκου των 3 ml.

Έχει επίσης δειχθεί ότι η αιθανόλη στην εν λόγω υψηλή συγκέντρωση μειώνει δραστικά την λειτουργικότητα της λιποξυγονάσης. Με την χρησιμοποίηση της μεθόδου που περιγράψαμε παραπάνω, επιτυγχάνουμε μια ειδική δραστηριότητα λιποξυγονάσης, τουλάχιστον 3 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη δραστηριότητα που λαμβάνουμε όταν χρησιμοποιούμε την μέθοδο με την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης. Επίσης έχει δειχθεί ότι χρησιμοποιώντας λιγότερες από 500 ενζυμικές μονάδες ανά ίσο αντιδρώντα όγκο, μπορούν να προκύψουν σημαντικώς χαμηλότερη ειδική λιποξυγονασική δραστηριότητα. Επίσης το διάλυμα του ενζύμου πρέπει να χορηγείται όσο το δυνατόν γρηγορότερα στην κυψελίδα αντίδρασης.

Θ. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Abies alba* + *Viscum album*.

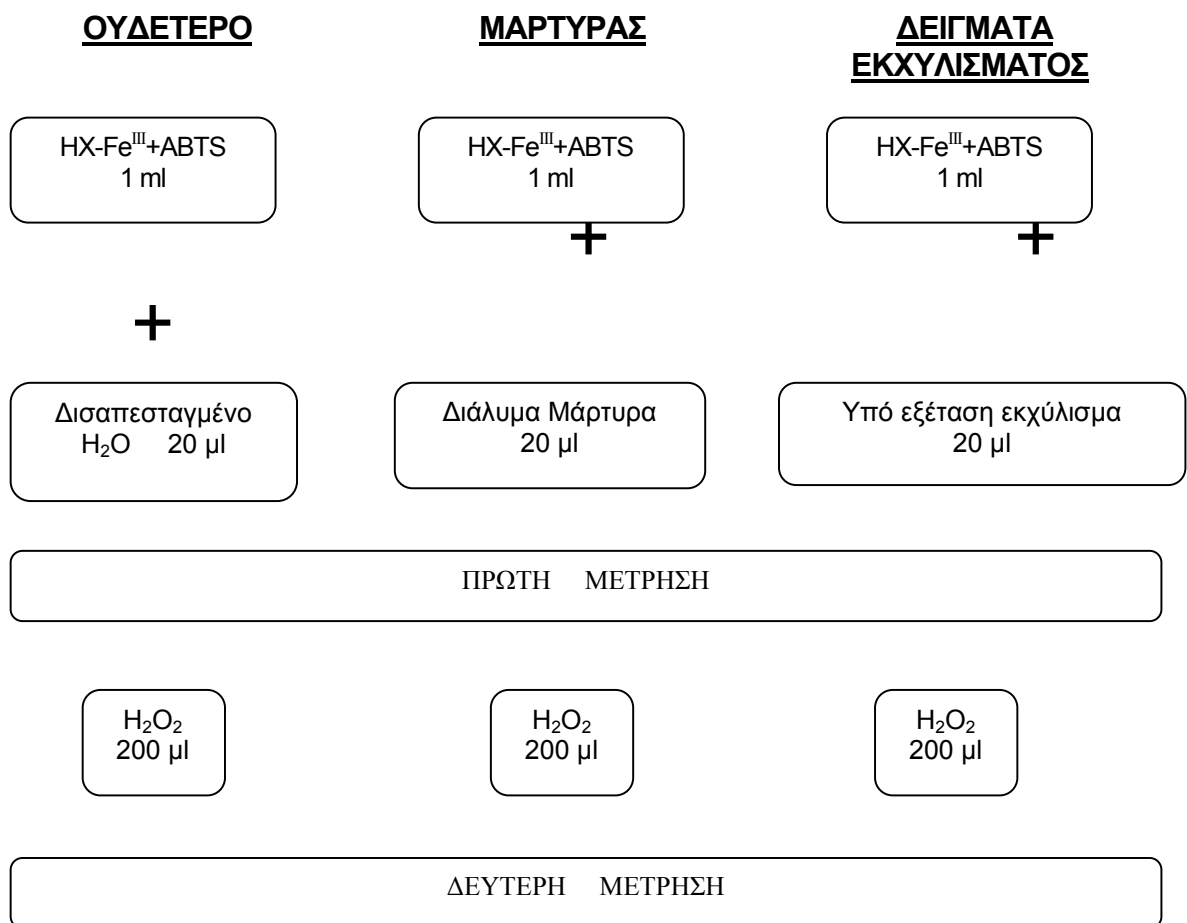
Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Status) του μικτού φυτικού εκχυλίσματος *Abies alba* και *Viscum album* μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο της εταιρείας Randox.

Κατά τη μέθοδο αυτή το ABTS (2,2-Azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulphonate]) επωάζεται με μια υπεροξειδάση μετμυοσφαιρίνης (metmyoglobin, HX-Fe^{III}) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), με αποτέλεσμα την παραγωγή της κατιονικής ρίζας ABTS⁺, σύμφωνα με τα παρακάτω:



Η κατιονική ρίζα ABTS^+ δίνει ένα σχετικά σταθερό κυανό - πράσινο χρώμα, το οποίο μετράται σε μήκος κύματος 600 nm στο φασματοφωτόμετρο. Αν προσθέσουμε διάφορα αντιοξειδωτικά στο υπό εξέταση δείγμα, τότε η αντίδραση αναστέλλεται, προκαλώντας εξασθένηση του χρώματος κυανό – πράσινο, σε βαθμό ανάλογο με την συγκέντρωσή τους.

Η πειραματική διάταξη παριστάνεται με τον ακόλουθο τρόπο:



Σχήμα 1: Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την μέθοδο Randox.

Όπως φαίνεται κι απ' το παραπάνω Σχήμα 1, ο μάρτυρας ήταν το διάλυμα του χρωμογόνου μαζί με το διάλυμα μάρτυρα που δίνει η μέθοδος. Η ποσότητα του μάρτυρα ήταν κάθε φορά όση και η ποσότητα του υπό εξέταση εκχυλίσματος.

Η ποσότητα του χρωμογόνου ήταν αντίστοιχη, ώστε κάθε φορά ανάλογα με την ποσότητα της υπό εξέταση ουσίας ή του αντιδραστηρίου του μάρτυρα, να διατηρείται σταθερός ο τελικός όγκος του διαλύματος της κυβέτας στα 1,22 ml.

Πάντα προσθέταμε στο τέλος 200 μl διαλύματος αντιδραστηρίου υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), για να αρχίσει η αντίδραση. Αμέσως μετά γινόταν εκκίνηση του χρονομετρητή.

Η μέτρηση λαμβάνονταν ακριβώς μετά 3 λεπτά από την προσθήκη του υποστρώματος (H_2O_2), ώστε να πραγματοποιούνταν η αντίδραση και να σταθεροποιούνταν το τελικό κατιονικό προϊόν, με αποτέλεσμα να λαμβάναμε αντιπροσωπευτική τιμή απορρόφησης ABS χωρίς διακυμάνσεις.

Με ανάλογο τρόπο ενεργούμε και στο υπό εξέταση δείγμα του φυτικού εκχυλίσματος *Abies alba* + *Viscum album*, όπου αντί για το διάλυμα μάρτυρα βάζουμε την αντίστοιχη ποσότητα της προς μελέτη ουσίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΙΣ ΟΜΑΔΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ

Σε όλες τις ομάδες ελέγχου, όπου προκαλείται χημική καρκινογένεση με την χρήση του 3,4 – βενζοπυρενίου, όπως περιγράφουμε στο κεφάλαιο των Υλικών – Μεθόδων, η επίτευξη της χημικής καρκινογένεσης είναι λίαν υψηλή και προσεγγίζει σε όλα τα επί μέρους πειράματα το 97 % των πειραματόζων. Εκτός αυτού η δημιουργία του όγκου λαμβάνει χώρα χωρίς την χρήση ενός δεύτερου χημικού παράγοντα, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προαγωγικό μέσον, όπως συμβαίνει σε άλλα πειράματα σχετικά με την χρήση άλλων πολυκυκλικών υδρογονανθράκων, εκτός του 3,4 – βενζοπυρενίου, το οποίο θεωρείται πλήρες καρκινογόνο. Ο μέσος όρος επιβίωσης των ζώων είναι 180 ± 34 , ενώ ο ελάχιστος χρόνος επιβίωσης είναι 144 ημέρες και ο μέγιστος 280 ημέρες. Αυτό που έχει σημασία είναι ότι τα δεδομένα της επιβίωσης των καρκινοπαθών επίμυων στο συγκεκριμένο μοντέλο είναι σταθερά, οπότε η δράση ενός παράγοντα είτε ως αναστολέα της χημικής καρκινογένεσης, είτε ως θεραπευτικού μέσου είναι πολύ εύκολο να εκτιμηθεί ποσοτικά και με ακρίβεια. Σύμφωνα με τα δεδομένα η καρκινογόνος ισχύς του 3,4 – βενζοπυρενίου είναι ίση προς = 56.

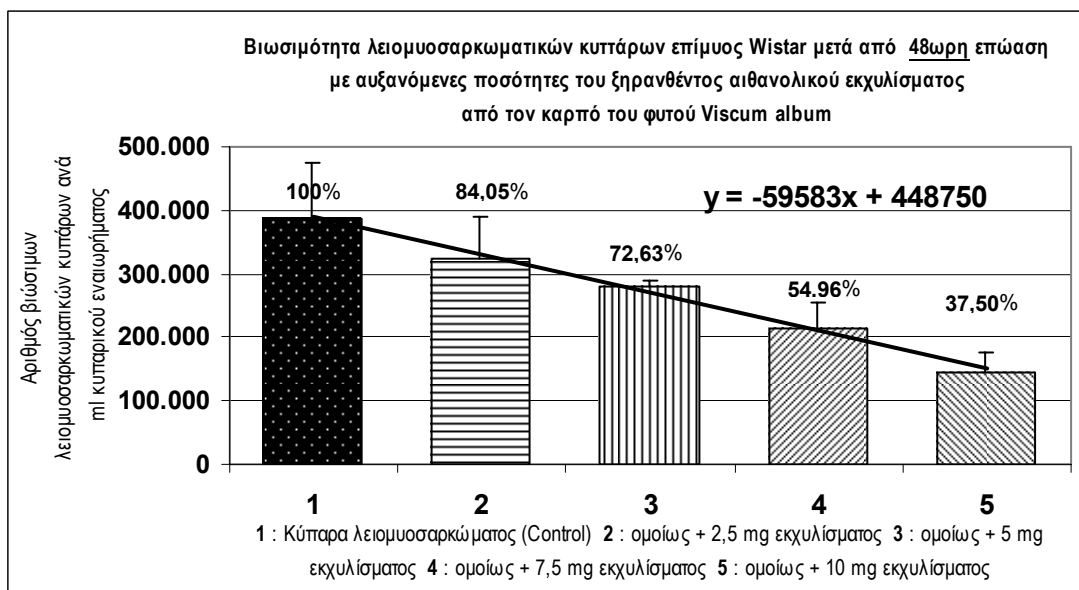
II. : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΠΙ ΤΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ W1STAR – ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.

A. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Viscum album*.

A(1). Δράση εκχυλισμάτων καρπών του *Viscum album*.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από αυτή την μεγάλη σειρά πειραμάτων είναι ενδιαφέροντα και αξιολογικά, συνοψίζονται δε στο συλλεκτικό διάγραμμα 1 που ακολουθεί:

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	386.667	325.000	280.833	212.500	145.000
SD	89.354	63.787	9.465	42.720	32.500



Διάγραμμα 1

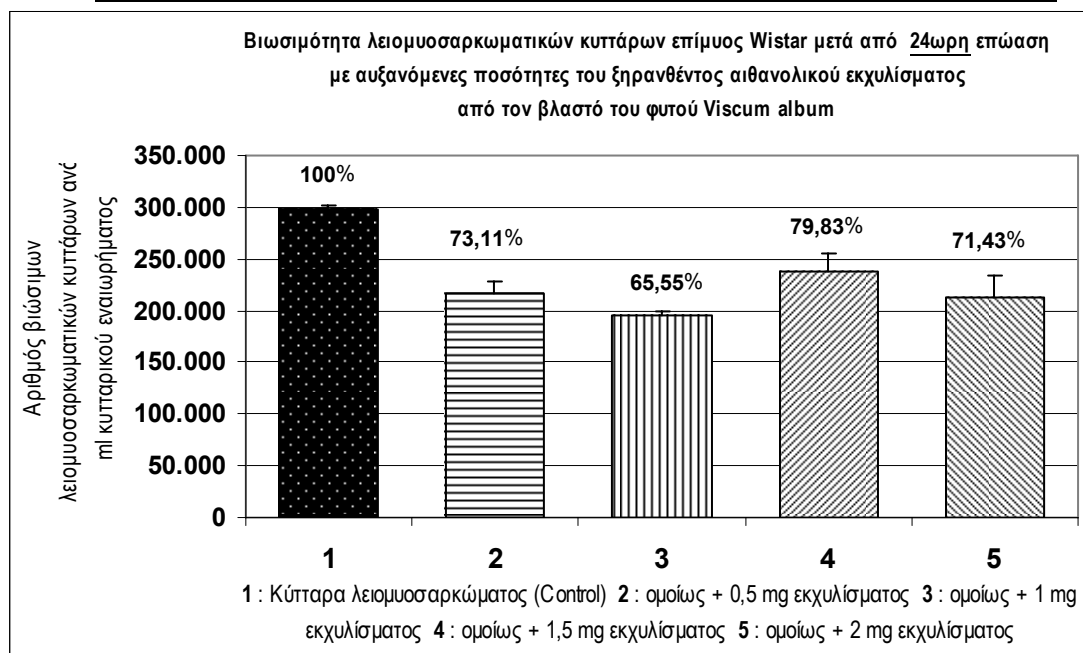
Από την εικόνα του διαγράμματος παρατηρούμε ότι οι δράσεις των διαφόρων γραμμικά αυξανόμενων ποσοτήτων του εκχυλίσματος καρπού του *Viscum album*, έχει τις γραμμικά αποτελέσματα στον θάνατο των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμοσ Wistar. Η εξίσωση η οποία περιγράφει την σχέση κυτταρικής βιωσιμότητας ως τις την δόση εκχυλίσματος είναι πρώτου βαθμού και εμφανίζεται στο άνω δεξιό μέρος του διαγράμματος. Μια ειδική παρατήρηση η οποία έγινε κατά την διεξαγωγή των εν λόγω πειραμάτων είναι και η ακόλουθη: Πολλά από τα κύτταρα του λειομυοσαρκώματος που εξετέθησαν στο εκχύλισμα του καρπού του φυτού φαίνεται να έχουν χάσει την εξωκυτταρική τις μεμβράνη, τις και αρκετά μεγάλο τμήμα του πρωτοπλάσματός τις, αποτελούμενα κατά μεγάλο μέρος από πυρήνες. Μια δεύτερη παρατήρηση είναι και η εξής: ο καρπός του εν λόγω φυτού περιέχει μια μεγάλη ποσότητα ιξώδους υλικού, το οποίο φαίνεται να σχηματίζει πολύ λεπτές μεμβράνες τις πυθμένες των τρυβλίων καλλιέργειας, με αποτέλεσμα κάποιοι αριθμοί κακοθών κυττάρων να εγκλωβίζονται στο ταπήτιο. Ωστόσο, δεδομένου ότι το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα με την ίδια ένταση σε όλα τα τρυβλία, τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι πολύ ανάλογα μεταξύ τις και δεν διαταράσσεται η γραμμικότητα μεταξύ αυτών.

A(2). Δράση εκχυλίσματος βλαστού *Viscum album*.

Τα πειράματα αυτά περιλαμβάνουν δύο ομάδες δοκιμών: την ομάδα 1, η οποία λαμβάνει χώρα με μικρές ποσότητες εκχυλίσματος (0,5 mgr, 1 mgr, 1,5 mgr, 2 mgr) και την ομάδα 2, η οποία λαμβάνει χώρα με μεγάλες ποσότητες εκχυλίσματος (2,5 mgr, 5 mgr, 7,5 mgr, 10 mgr).

Γενικά τις οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος έχουν άμεσες κυτταροτοξικές ιδιότητες απέναντι στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμουσ Wistar, αλλά τις μικρές ποσότητες (0,5 – 2 mgr) δεν υπάρχει καθαρή γραμμικότητα, τις φαίνεται από το σχετικό διάγραμμα 2, όπου η ποσότητα των 1,5 mgr και 2 mgr εκχυλίσματος εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα από τις μικρότερες συγκεντρώσεις των 0,5 και 1 mgr.

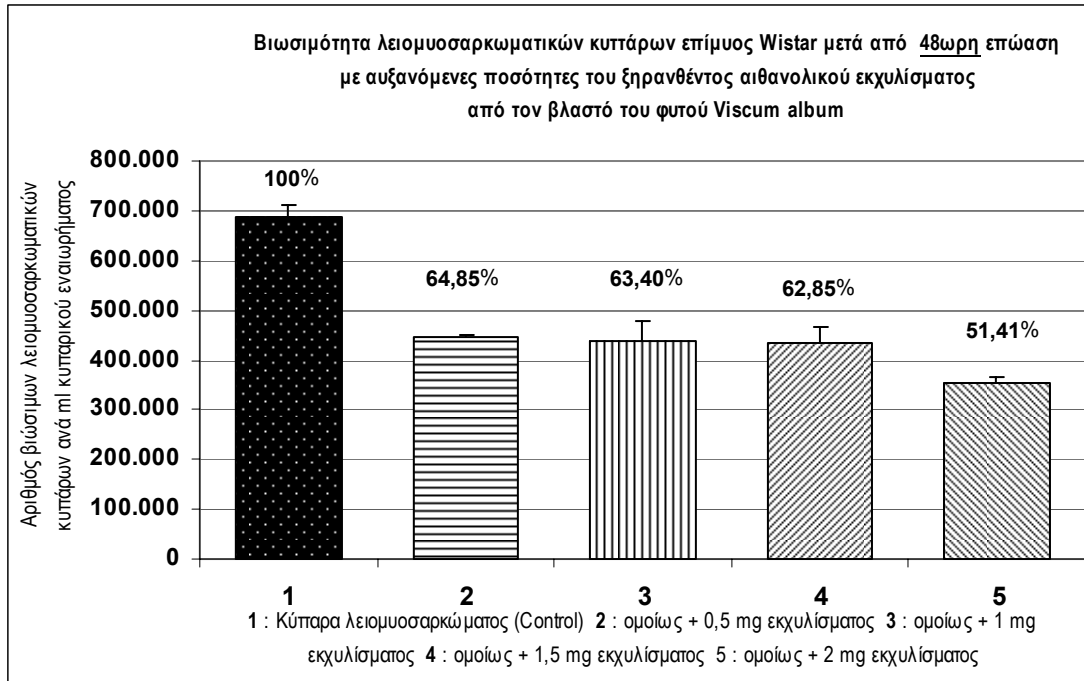
	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	297.500	217.500	195.000	237.500	212.500
SD	4.082	10.607	3.536	17.678	21.213



Διάγραμμα 2

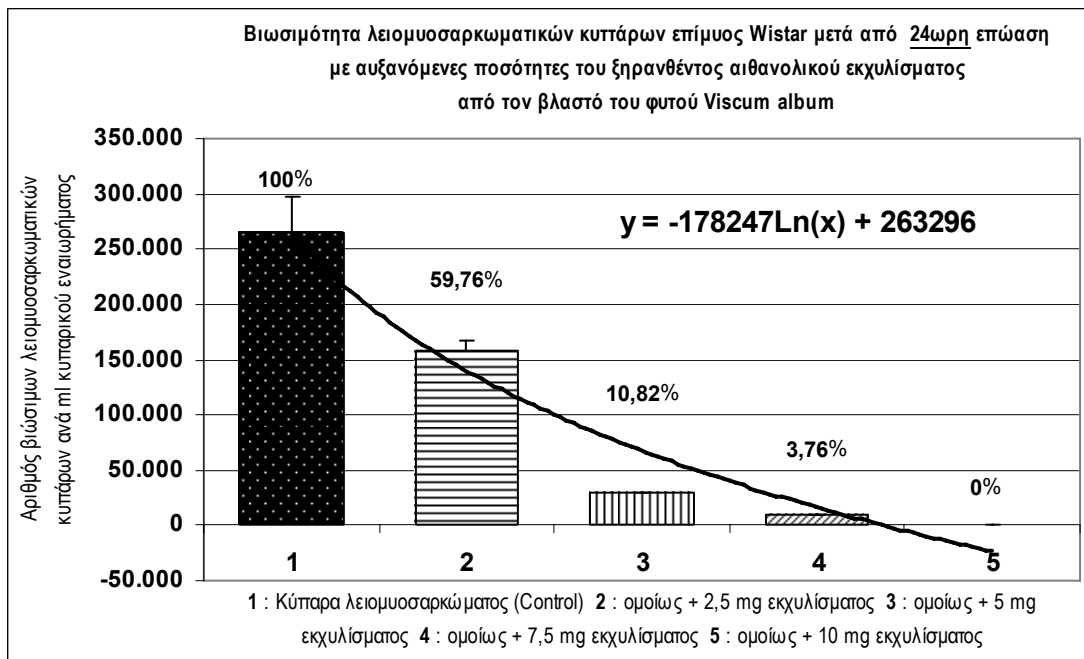
Ωστόσο η συνέχιση της επώασης των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επί 48 ώρες συνολικά στις ίδιες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος μας δίνει μια ομαλότερη και πιο μετριασμένη εικόνα των δράσεων των δόσεων του 1,5 και 2 mgr, όπως βλέπουμε από το σχετικό διάγραμμα 3.

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	688.125	446.250	436.250	432.500	353.750
SD	22.115	5.303	40.659	35.355	12.374

**Διάγραμμα 3**

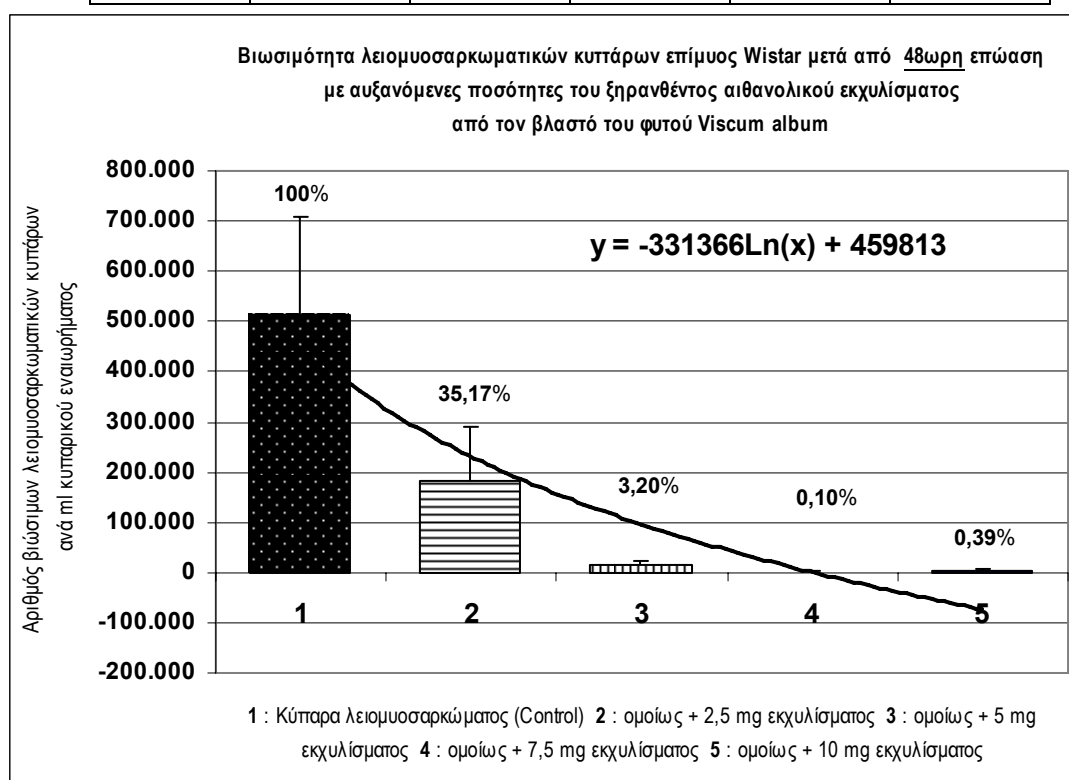
Η δράση των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων (2,5 – 10 mg) φαίνεται επίσης ότι έχει πορεία που θυμίζει μια υπερβολή, με αντίστοιχη εξίσωση την εμφανιζόμενη στο σχετικό διάγραμμα 4, που απεικονίζει την κυτταροτοξικότητα στις 24 ώρες επώασης.

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	265.625	158.750	28.750	10.000	0
SD	32.556	8.839	1.768	0	0

**Διάγραμμα 4**

Η προέκταση του ελέγχου της κυτταροτοξικότητας των ιδίων υψηλών δόσεων εκχυλίσματος επί 48 ώρες μας έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με μια μικρή παραλλακτικότητα στην εξίσωση περιγραφής του φαινομένου, όπως βλέπουμε από το διάγραμμα 5. Οι αρνητικές τιμές στους αριθμούς των κυττάρων που εμφανίζονται στα εν λόγω δύο διαγράμματα δεν έχουν φυσική σημασία, αλλά ετέθησαν από τον υπολογιστή προκειμένου να δούμε την προβολή της δράσης της πέμπτης χρησιμοποιηθείσας ποσότητας εκχυλίσματος (10 mg).

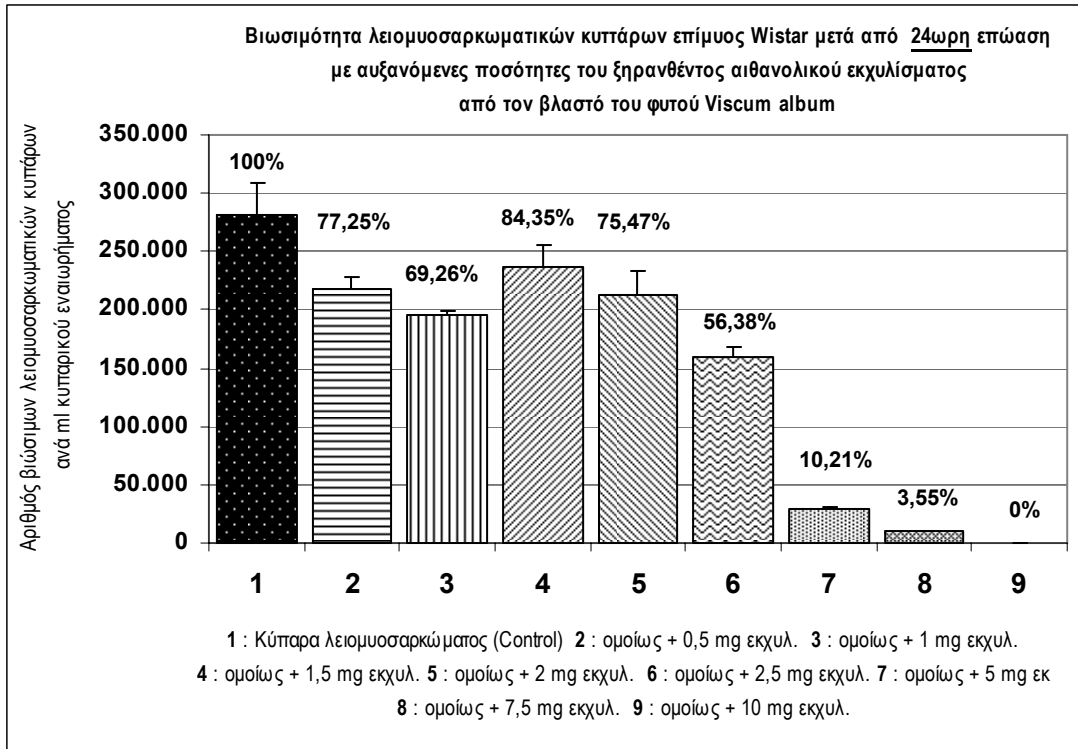
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	513.250	180.500	16.400	500	2.000
SD	195.991	109.792	8.280	1.118	4.472



Διάγραμμα 5

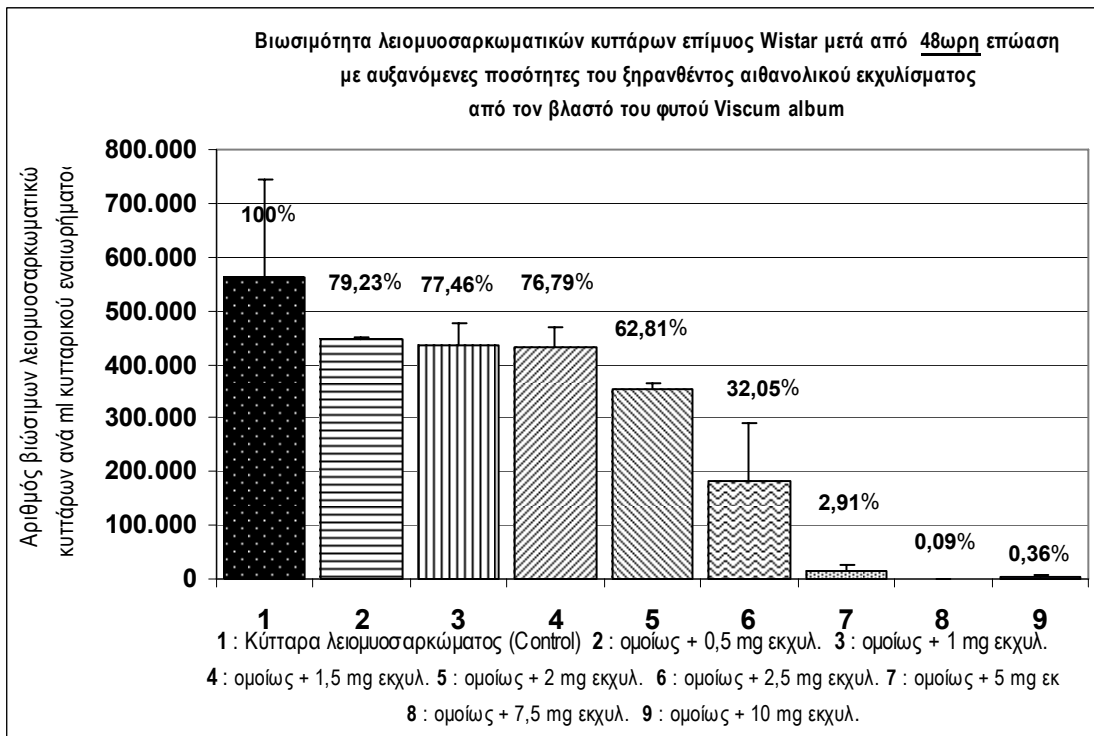
Τα συγκεντρωτικά διαγράμματα των εν λόγω σειρών πειραμάτων δοκιμής της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος του βλαστού *Viscum album* φαίνονται στο διάγραμμα 6 (24 ώρες) και διάγραμμα 7 (48 ώρες).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	281.563	217.500	195.000	237.500	212.500	158.750	28.750	10.000	0
SD	27.417	10.607	3.536	17.678	21.213	8.839	1.768	0	0



Διάγραμμα 6

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	563.214	446.250	436.250	432.500	353.750	180.500	16.400	500	2.000
SD	182.831	5.303	40.659	35.355	12.374	109.792	8.280	1.118	4.472

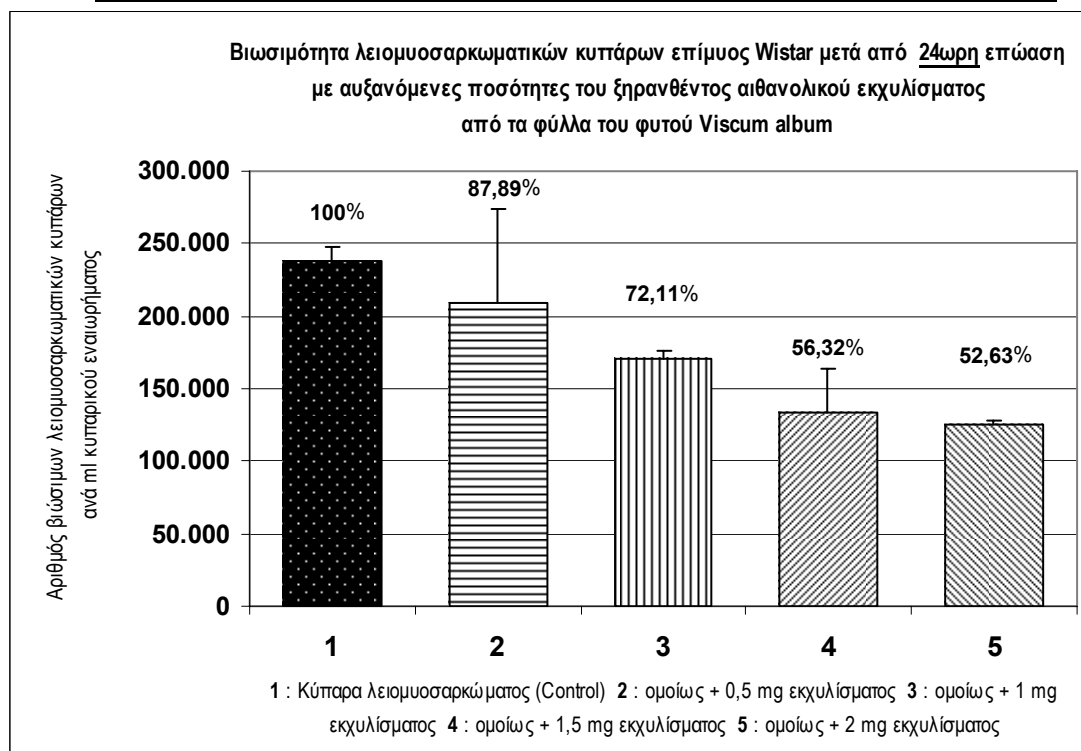


Διάγραμμα 7

A(3). Δράση εκχυλίσματος φύλλου *Viscum album*.

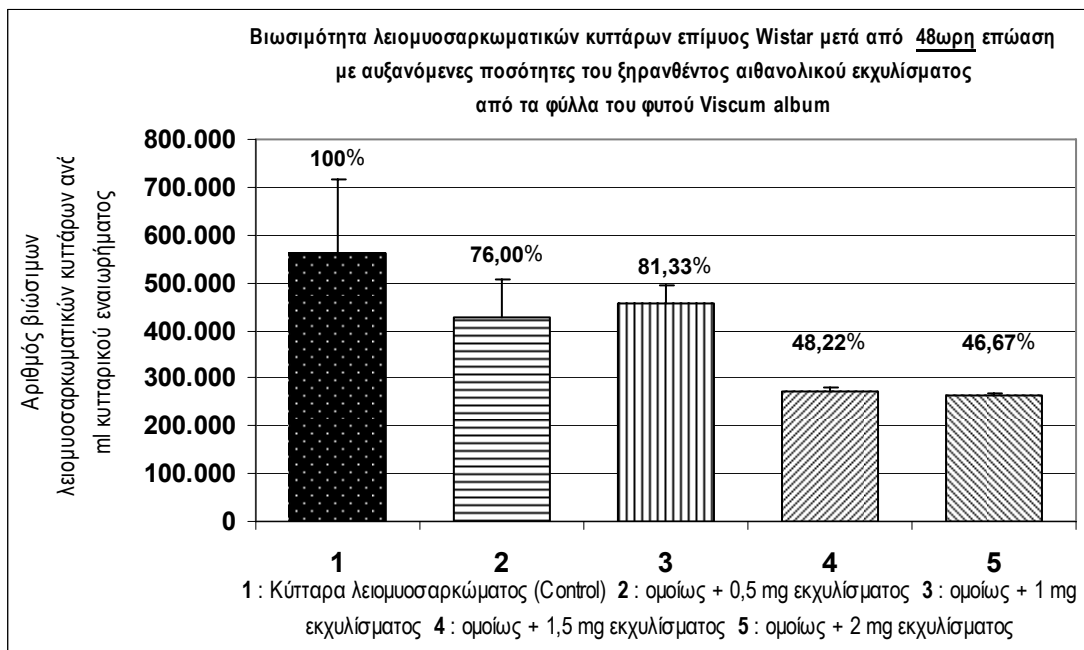
Στα εν λόγω πειράματα μελετήθηκαν οι κυτταροτοξικές δράσεις των εκχυλισμάτων των φύλλων του φυτού *Viscum album* κατόπιν επώασης 24 και 48 ωρών με δύο σχήματα δόσεων υλικού, ένα σχήμα που περιλαμβάνει μικρές δόσεις (0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg και 2 mg) και ένα σχήμα που περιλαμβάνει μεγάλες δόσεις (2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg και 10 mg υλικού). Τα δεδομένα αναπαράγουν με αρκετή πιστότητα ένα παρόμοιο πρότυπο θανατηφόρων δράσεων που έχουμε δει και για τα εκχυλίσματα των δύο προηγούμενων ιστών του φυτού (καρπός και βλαστός). Επίσης οι δράσεις των ιδίων δόσεων είναι προσεγγιστικά ανάλογες και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των ιστών των φύλλων, με τις αντίστοιχες δράσεις των αυτών δόσεων των εκχυλισμάτων καρπών και βλαστών. Η δράση των μικρών δόσεων για το 24ωρο και το 48ωρο φαίνεται στο διάγραμμα 8 και στο διάγραμμα 9.

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	237.500	208.750	171.250	133.750	125.000
SD	10.607	65.407	5.303	30.052	3.536



Διάγραμμα 8

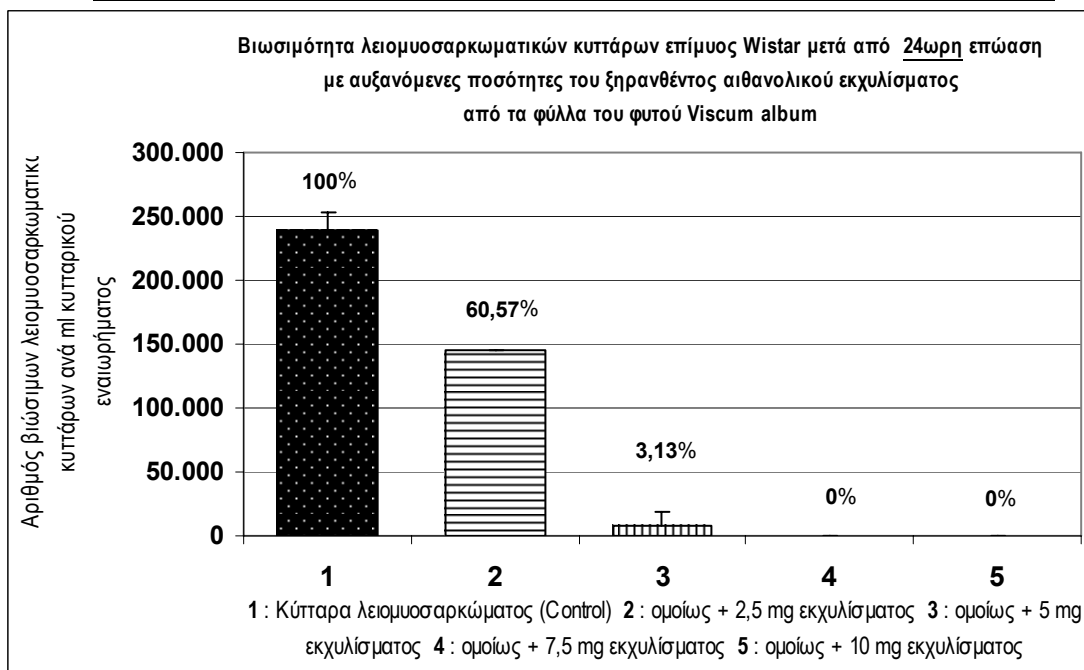
	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	562.500	427.500	457.500	271.250	262.500
SD	152.439	81.317	35.355	8.839	7.071



Διάγραμμα 9

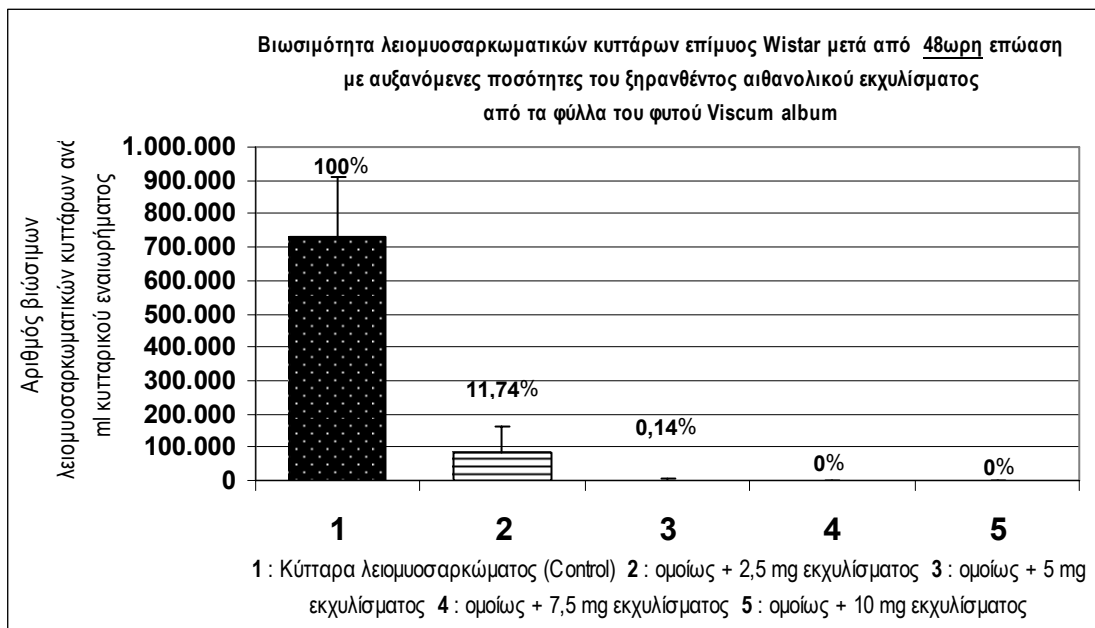
Οι δράσεις των μεγάλων δόσεων φαίνονται στο διάγραμμα 10 (24 ώρες επώαση) και στο διάγραμμα 11 (48 ώρες επώαση).

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	239.375	145.000	7.500	0	0
SD	14.197	0	10.607	0	0



Διάγραμμα 10

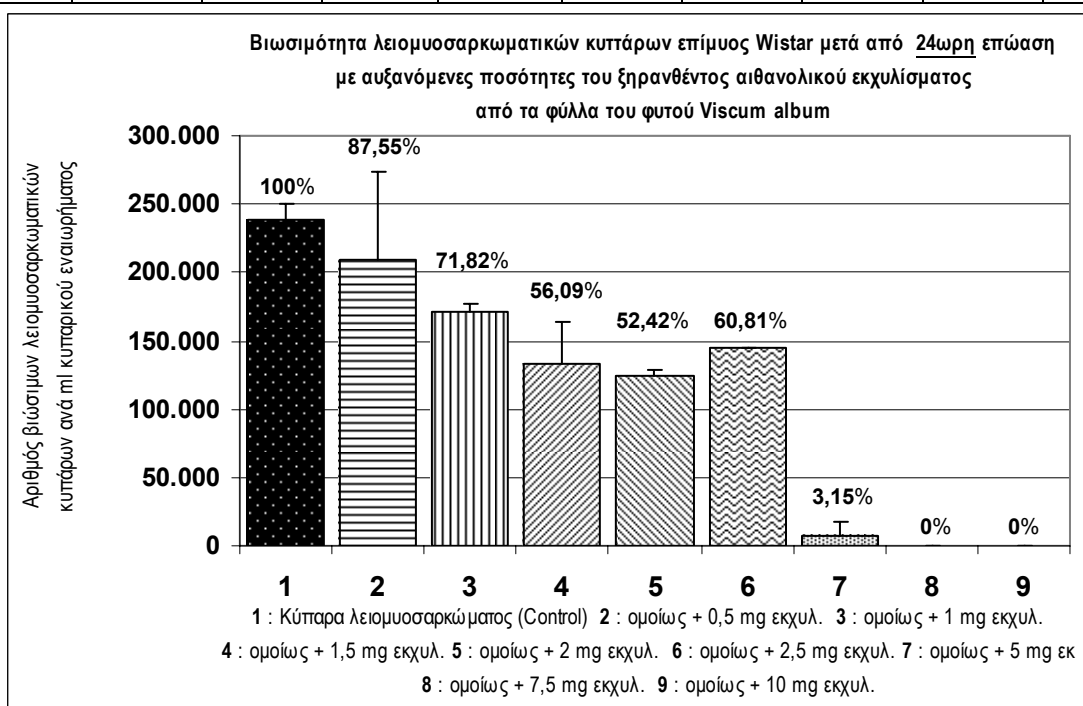
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	732.500	86.000	1.000	0	0
SD	179.455	75.882	2.236	0	0



Διάγραμμα 11

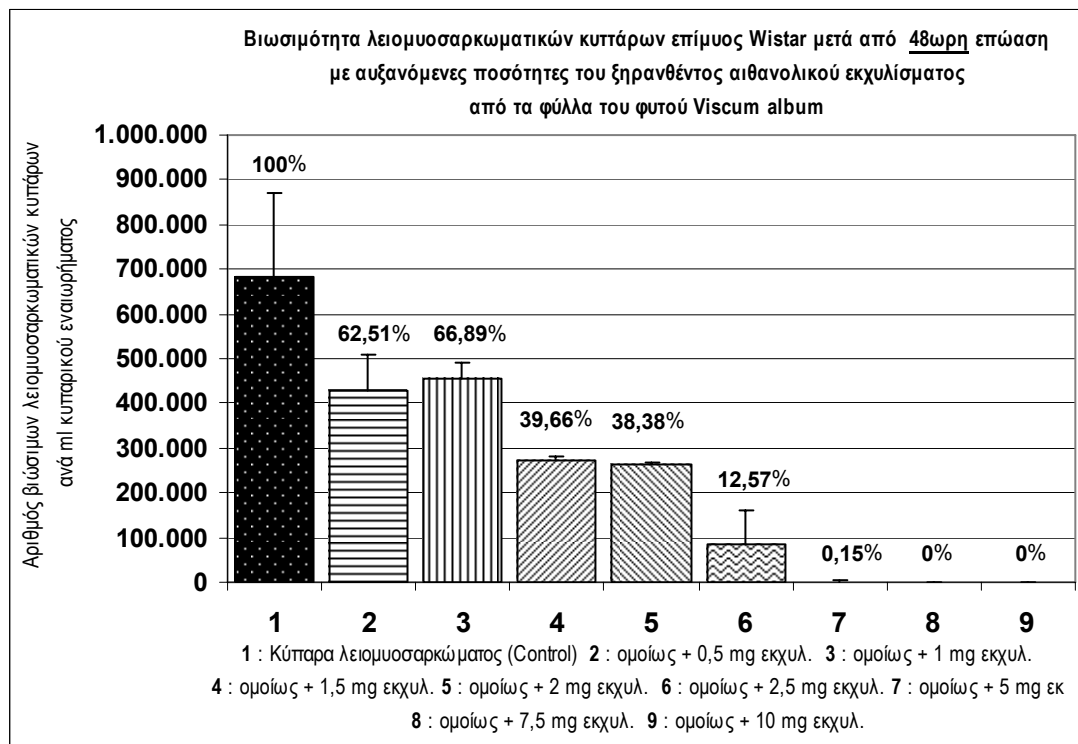
Συνολικά οι δράσεις όλων των δόσεων κατόπιν 24 και 48 ωρών επώασης αντιστοίχως, φαίνονται στα συγκεντρωτικά διαγράμματα 12 & 13.

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	238.438	208.750	171.250	133.750	125.000	145.000	7.500	0	0
SD	11.645	65.407	5.303	30.052	3.536	0	10.607	0	0



Διάγραμμα 12

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	683.929	427.500	457.500	271.250	262.500	86.000	1.000	0	0
SD	184.416	81.317	35.355	8.839	7.071	75.882	2.236	0	0



Διάγραμμα 13

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *Abies alba*.

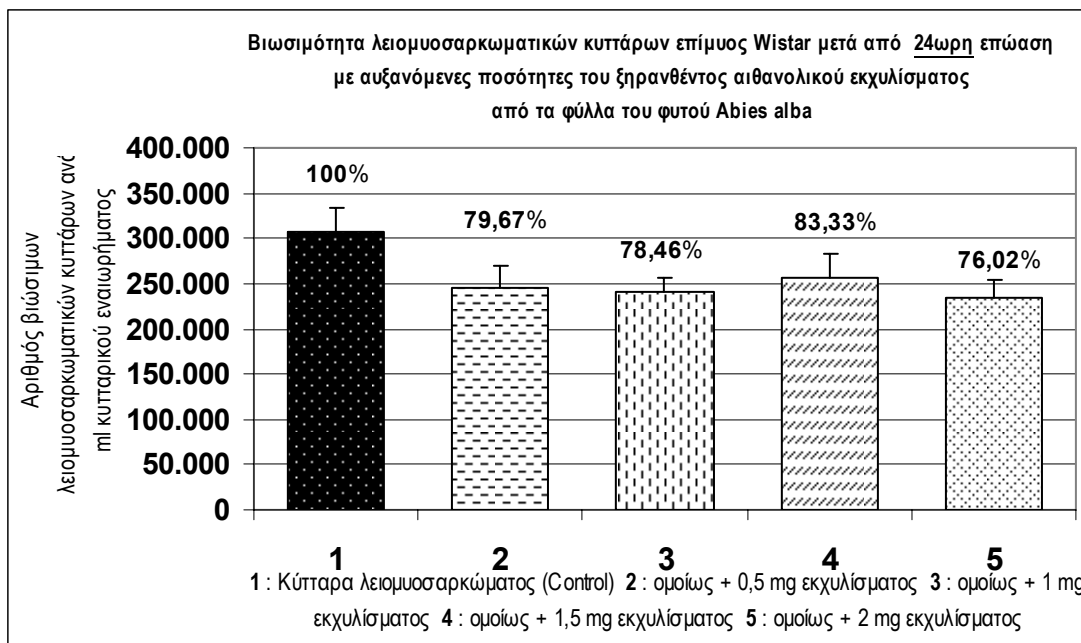
Όπως και στην περίπτωση του *Viscum album*, μελετήσαμε επίσης την κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων του ξενιστή αυτού *Abies alba*. Συγκεκριμένα μελετήσαμε τις δράσεις των εκχυλισμάτων του φύλλου, του φλοιού, του ξύλου, αλλά και της περιοχής συνέργειας μεταξύ του ξενιστή και του παρασιτικού φυτού, σε δύο σχήματα δόσεων (μικρές δόσεις 0,5 mg – 1,0 mg – 1,5 mg – 2,0 mg και μεγάλες δόσεις 2,5 mg – 5 mg – 7,5 mg – 10 mg) και σε δύο χρονικές ζώνες έκθεσης, 24ωρης και 48ωρης διάρκειας αντιστοίχως.

B(1). Δράση εκχυλίσματος φύλλου *Abies alba*.

Η 24ωρη επώαση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων με μικρές ποσότητες εκχυλίσματος *Abies alba* δίνει ένα μικρό κυτταροτοξικό

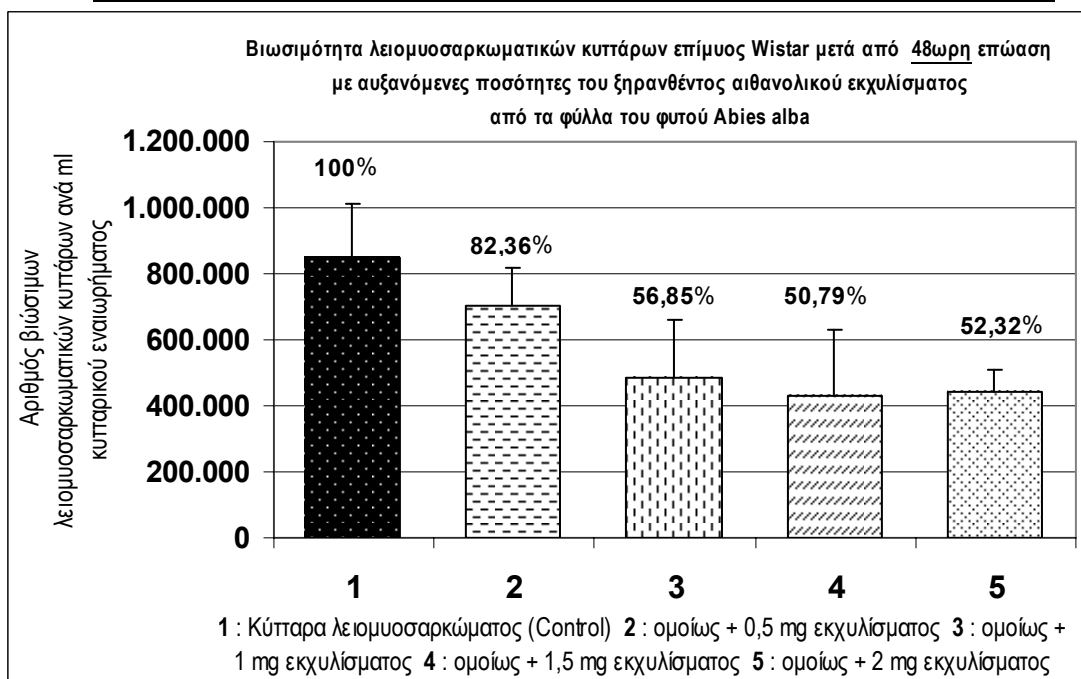
αποτέλεσμα που παρουσιάζει μια πολύ μικρή αύξηση ανάλογη προς την χρησιμοποιούμενη δόση (διάγραμμα 14).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	307.500	245.000	241.250	256.250	233.750
SD	26.848	24.749	15.910	26.517	19.445



Διάγραμμα 14

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	850.500	700.500	483.500	432.000	445.000
SD	159.730	115.033	177.866	200.354	64.104

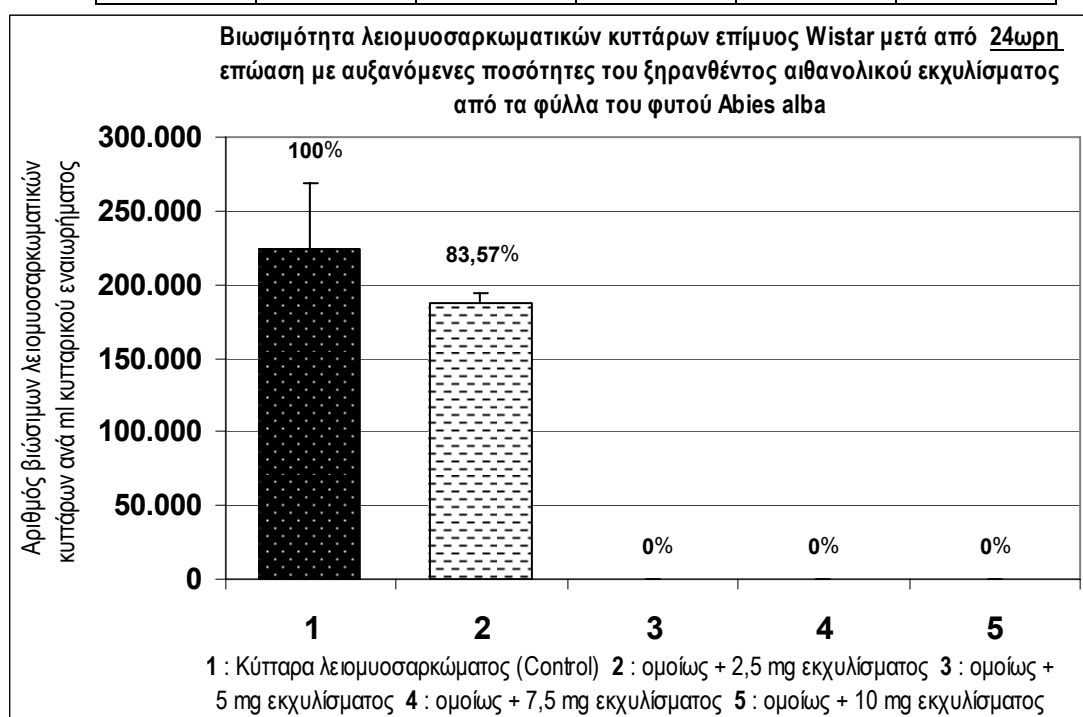


Διάγραμμα 15

Στις 48 ώρες επώασης η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος των φύλλων είναι περισσότερο σαφής, αλλά παρουσιάζει μια σχετική επιπέδωση μεταξύ των δόσεων 1mg – 1,5 mg – 2 mg υλικού, ανά τρυβλίο 3 ml. Η δράση της 48ωρης επώασης φαίνεται στο διάγραμμα 15.

Η δράση των μεγάλων δόσεων είναι σαφέστερη, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 16, όπου η βιωσιμότητα των νεοπλασματικών κυττάρων κατακρημνίζεται στο μηδέν αμέσως μετά την δόση των 5 mg εκχυλίσματος ανά τρυβλίο 3 ml, όταν η επώαση είναι 24ωρης διάρκειας.

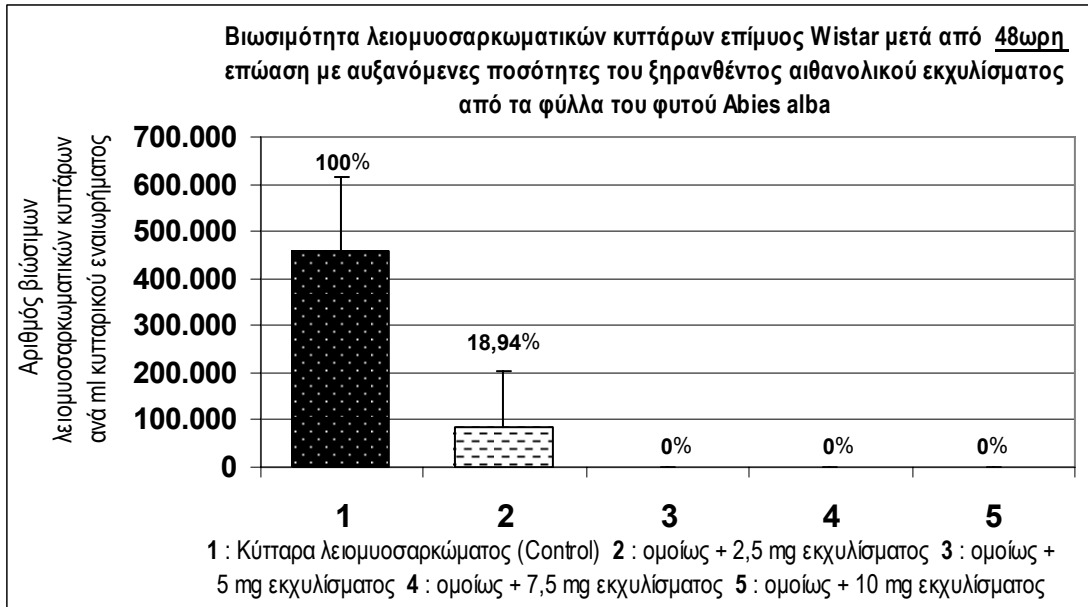
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	224.375	187.500	0	0	0
SD	43.893	7.071	0	0	0



Διάγραμμα 16

Το ίδιο αποτέλεσμα ισχύει και για την επώαση των 48 ωρών με τις ίδιες δόσεις εκχυλίσματος *Abies alba*, ενώ είναι χαρακτηριστική η σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, από τα 2,5 mg (διάγραμμα 17).

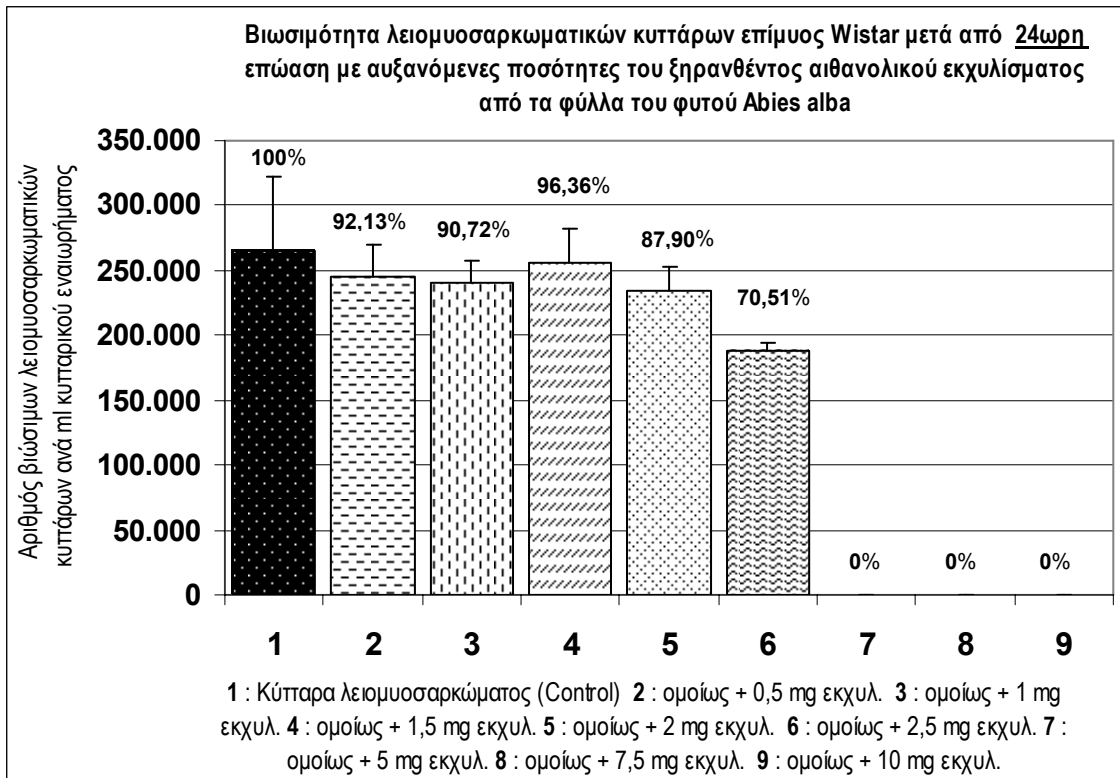
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	456.750	86.500	0	0	0
SD	157.683	118.712	0	0	0



Διάγραμμα 17

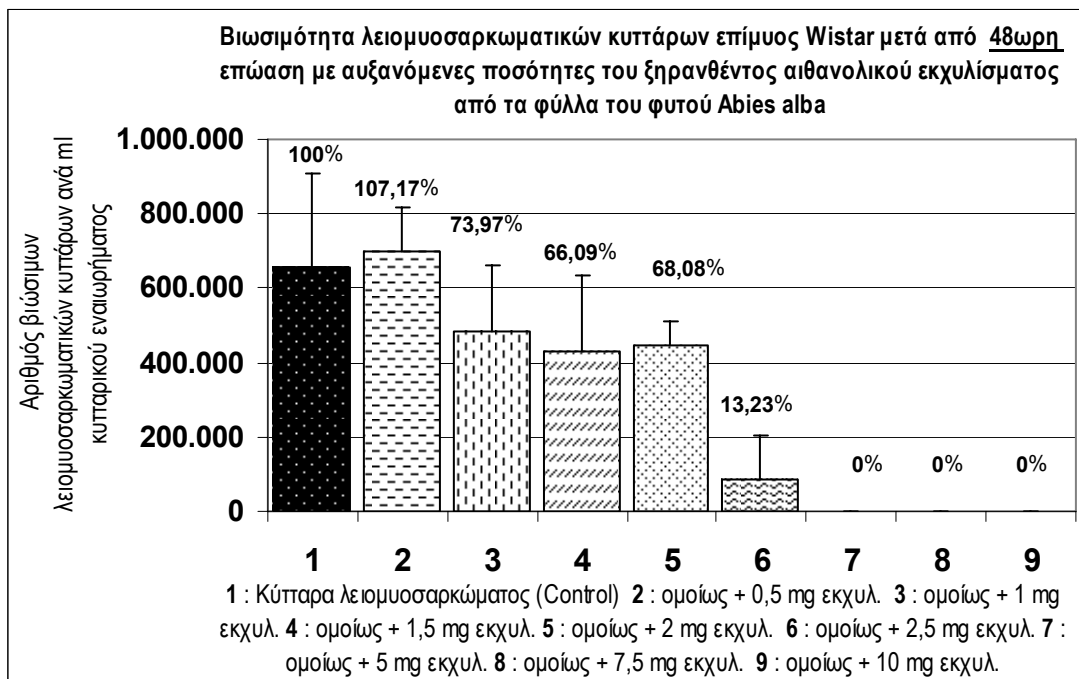
Τα δεδομένα αυτά φαίνονται σε συγκεντρωτικά διαγράμματα που περιέχουν τις δράσεις όλων των δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν για επωάσεις 24 και 48 ωρών (διάγραμμα 18 & διάγραμμα 19).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	265.938	245.000	241.250	256.250	233.750	187.500	0	0	0
SD	55.757	24.749	15.910	26.517	19.445	7.071	0	0	0



Διάγραμμα 18

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	653.625	700.500	483.500	432.000	445.000	86.500	0	0	0
SD	254.289	115.033	177.866	200.354	64.104	118.712	0	0	0



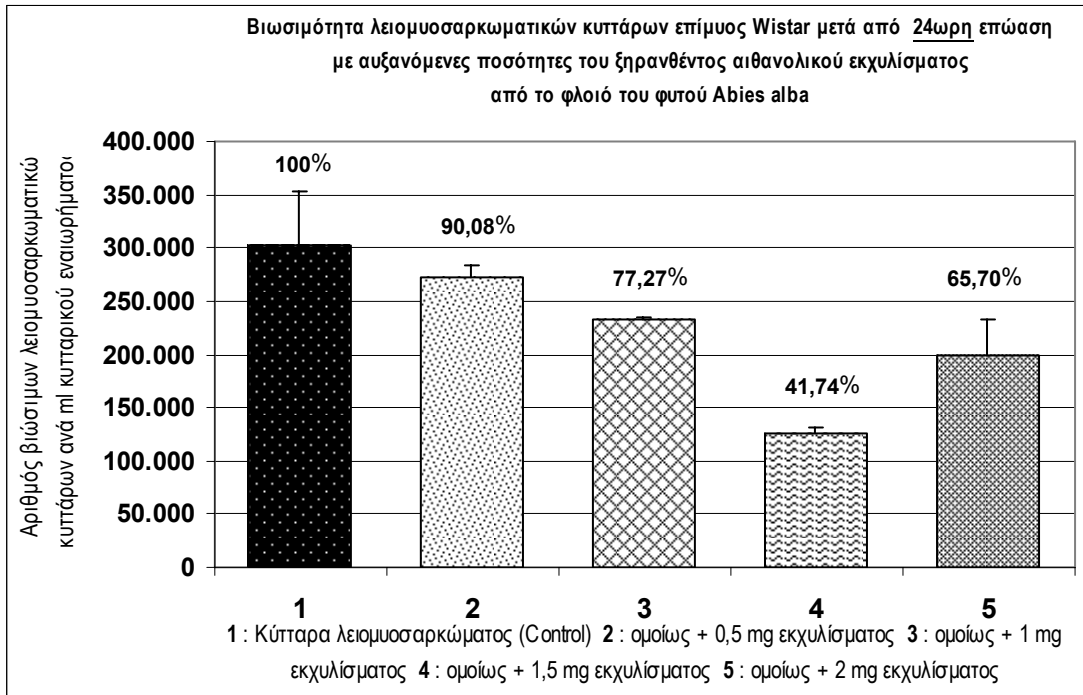
Διάγραμμα 19

B(2). Δράση εκχυλίσματος φλοιού *Abies alba*.

Οι αντικαρκινικές δράσεις του εκχυλίσματος των πράσινων τμημάτων του φλοιού του *Abies alba* μελετήθηκαν σε δύο σχήματα δόσεων: ένα σχήμα μικρών δόσεων (0,5 mg – 1,0 mg – 1,5 mg – 2,0 mg) και ένα σχήμα μεγάλων δόσεων (2,5 mg – 5 mg – 7,5 mg – 10 mg), όπως και ανωτέρω, σε δύο χρονικά διαστήματα επώασης, δηλαδή 24 ωρών και 48 ωρών.

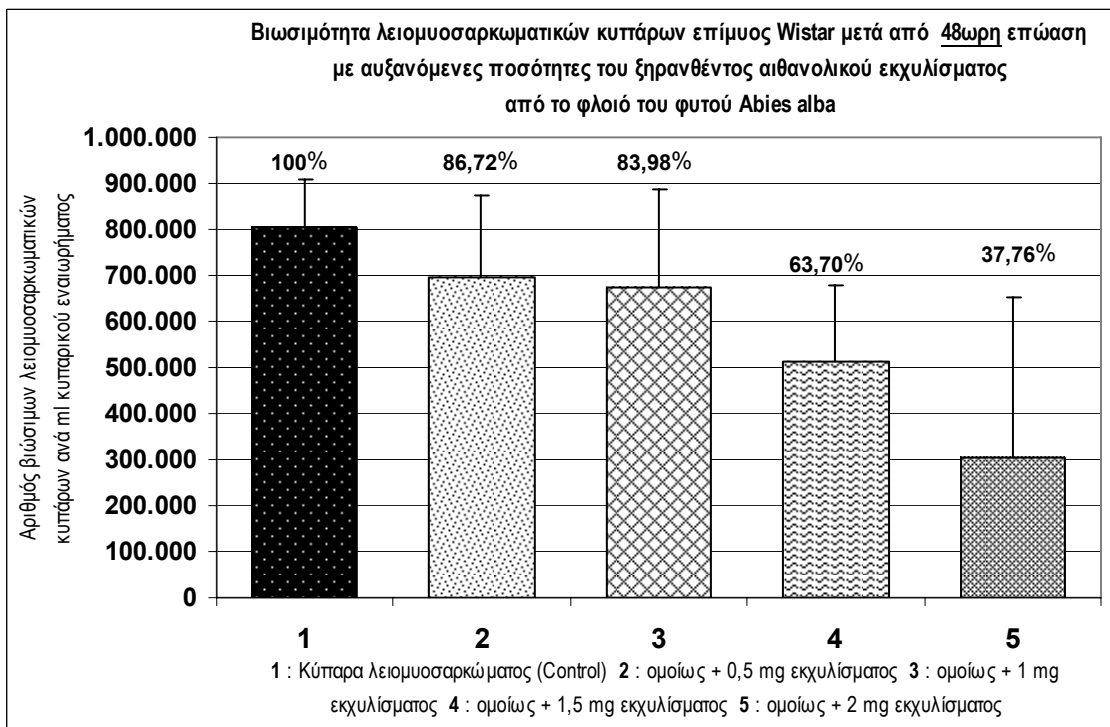
Τα δεδομένα δείχνουν ότι ήδη οι μικρές δόσεις εκχυλίσματος *Abies alba* εμφανίζουν άμεση κυτταροτοξικότητα στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα. Η εν λόγω δράση φαίνεται να εμφανίζει γραμμικότητα ακόμη και στις χαμηλές δόσεις, παρά μια ανωμαλία που εμφανίζεται στο διάγραμμα 20. Στο εν λόγω διάγραμμα φαίνεται ότι η δόση των 2 mg εκχυλίσματος έχει μεν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από τις δόσεις των 0 mg, 5 mg και 1 mg, αλλά μικρότερη από εκείνη των 1,5 mg. Η διακύμανση αυτή εμφανίζεται μόνον στην επώαση των 24 ωρών, αλλά όχι στην επώαση των 48 ωρών, όπου το μέγεθος της κυτταροτοξικότητας είναι σαφώς δόσοεξαρτώμενο (διάγραμμα 21).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	302.500	272.500	233.750	126.250	198.750
SD	50.042	10.607	1.768	5.303	33.588



Διάγραμμα 20

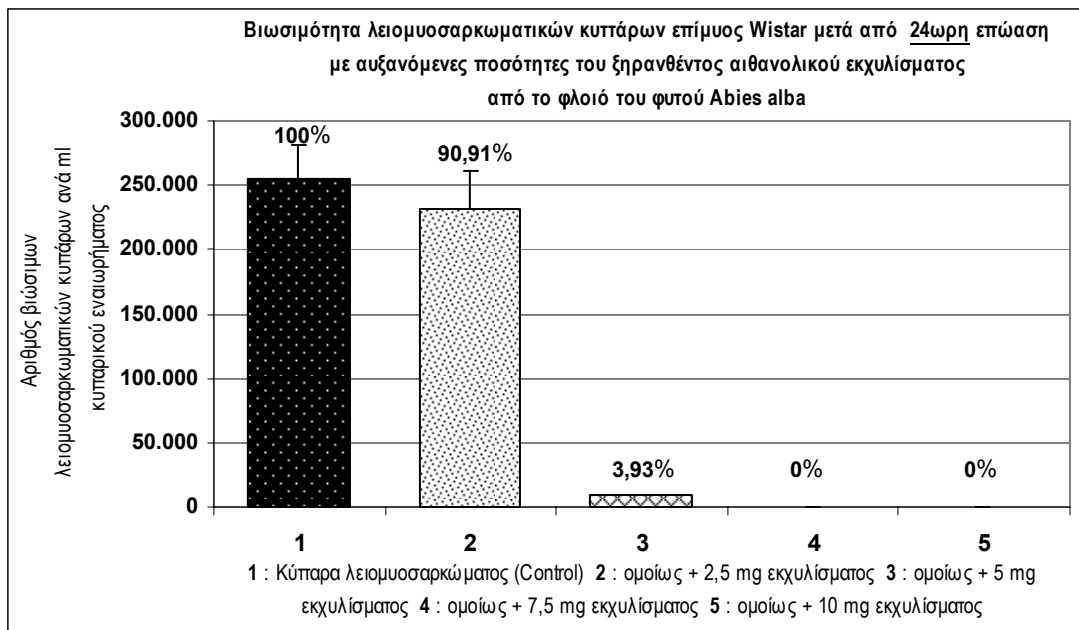
	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	803.750	697.000	675.000	512.000	303.500
SD	107.091	177.407	211.128	167.317	350.654



Διάγραμμα 21

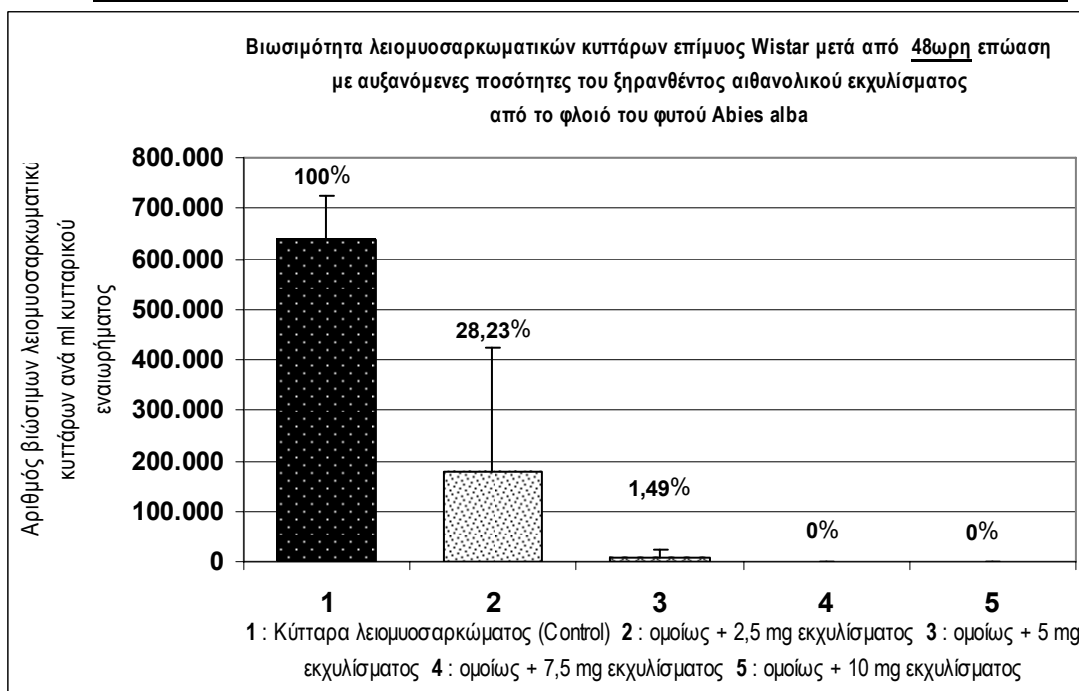
Στην σειρά των μεγάλων δόσεων η δόσοεξάρτηση της κυτταροτοξικότητας είναι σαφέστατη, τόσο για τις επωάσεις των 24 (διάγραμμα 22) όσο και των 48 ωρών (διάγραμμα 23).

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	254.375	231.250	10.000	0	0
SD	26.408	30.052	0	0	0



Διάγραμμα 22

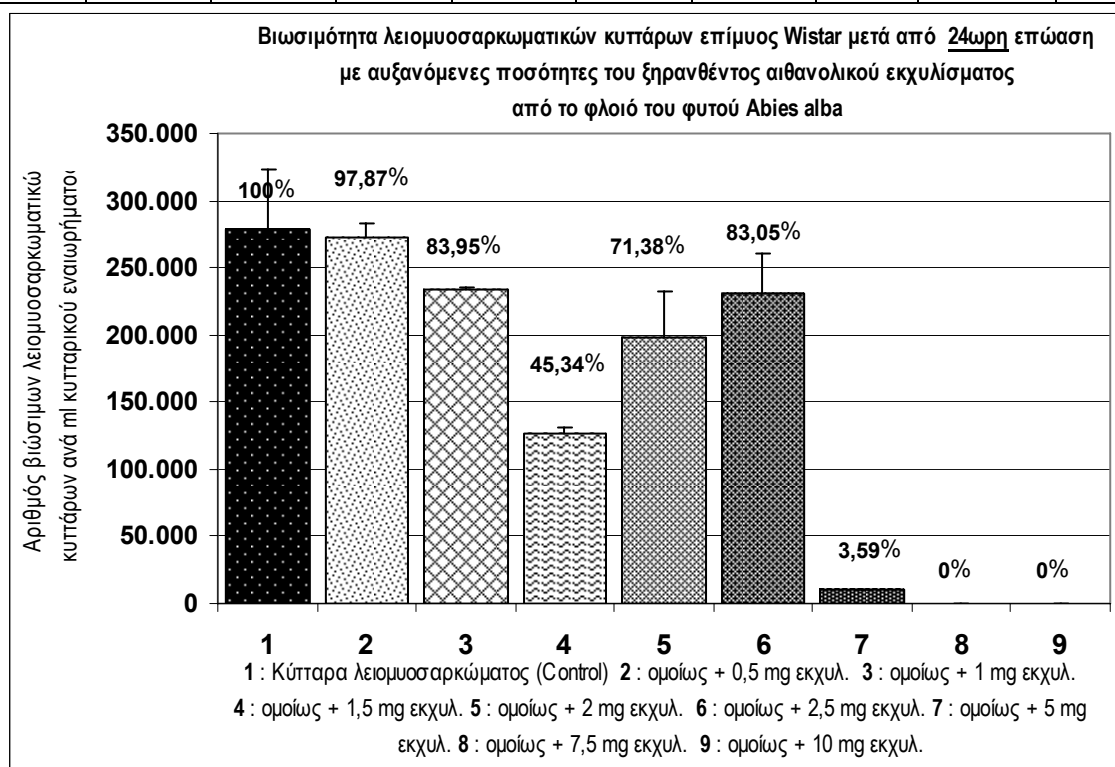
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	635.750	179.500	9.500	0	0
SD	89.854	246.059	13.038	0	0



Διάγραμμα 23

Είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι ο ρυθμός θανάτου των λειομυοσαρκοματικών κυττάρων στις μεγάλες δόσεις του εκχυλίσματος του *Abies alba* είναι πολύ ανάλογος με τον ρυθμό θανάτου που βλέπουμε να επικρατεί για τα εκχυλίσματα και του *Viscum album*. Γενικότερα τα συγκεντρωτικά διαγράμματα των 24 και 48 ωρών επώασης των λειομυοσαρκοματικών κυττάρων με όλες τις δόσεις του εκχυλίσματος των φλοιών του ξενιστή (διάγραμμα 24 και διάγραμμα 25, αντιστοίχως) εμφανίζουν αρκετή ομοιότητα με τα αντίστοιχα συγκεντρωτικά διαγράμματα για το εκχύλισμα του βλαστού, αλλά και των φύλλων του παρασιτικού φυτού (διαγράμματα 6 – 7 – 12 – 13).

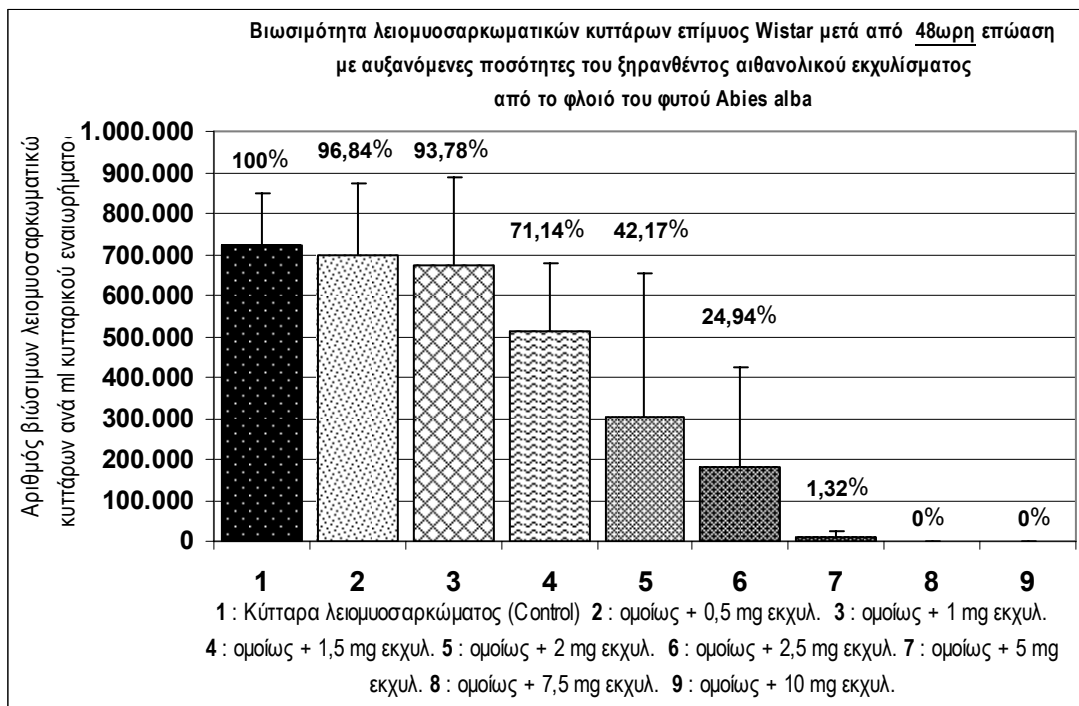
	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	278.438	272.500	233.750	126.250	198.750	231.250	10.000	0	0
SD	45.098	10.607	1.768	5.303	33.588	30.052	0	0	0



Διάγραμμα 24

Είναι πολύ πιθανόν οι εν λόγω ομοιότητες να αιτιολογούνται από την ύπαρξη κάποιων κυτταροτοξικών ουσιών που υπάρχουν από κοινού και στα δύο εν λόγω φυτά. Είναι δε αξιόλογο ότι οι εν λόγω υποτιθέμενες ουσίες φαίνεται να αφθονούν στα πράσινα μέρη και των δύο αλληλεπιδρώντων φυτών. Να σημειώσουμε ότι η ισχυρή δράση των εκχυλισμάτων του φλοιού του *Abies alba* εκδηλώνεται σαφέστατα στις 48 ώρες επώασης και συνεπώς φαίνεται δόσοεξαρτώμενη (διάγραμμα 25).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	719.750	697.000	675.000	512.000	303.500	179.500	9.500	0	0
SD	129.167	177.407	211.128	167.317	350.654	246.059	13.038	0	0



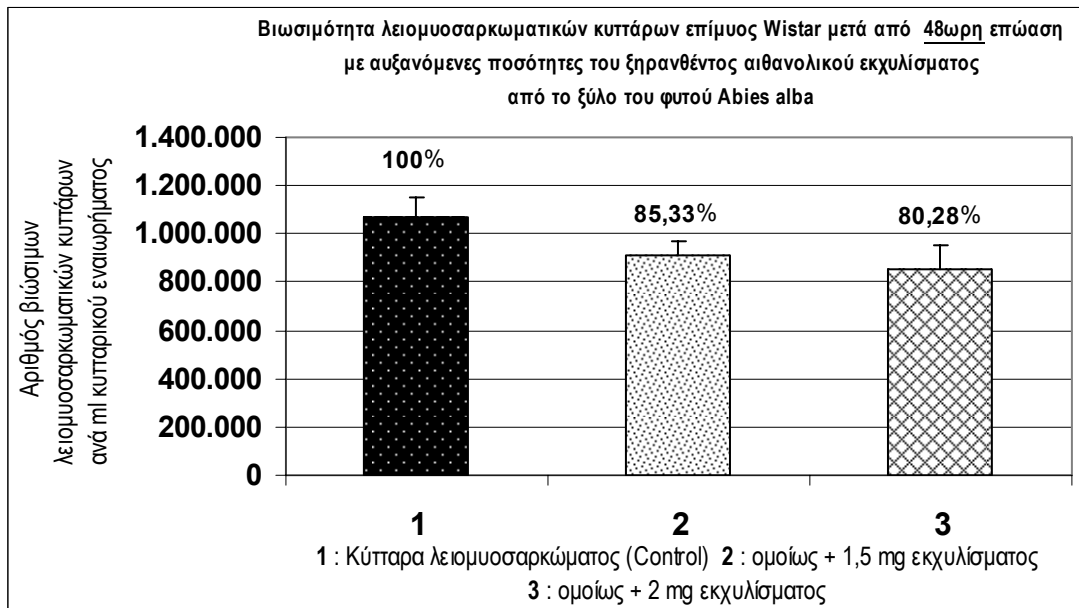
Διάγραμμα 25

B(3). Δράση εκχυλίσματος ξύλου *Abies alba*.

Τα εκχυλίσματα του ξύλου έχουν μελετηθεί σε λιγότερες ποσότητες στερεού υλικού συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιήσαμε τόσο για το φύλλο, όσο και το φλοιό, μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης. Δηλαδή και σε αυτή την περίπτωση είχαμε δύο δοσολογικά σχήματα, ένα χαμηλών και ένα υψηλών δόσεων (1,5 mg – 2 mg και 2,5 mg – 5,0 mg – 7,5 mg – 10 mg, αντιστοίχως), ενώ η επώαση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων με κάθε μια εξ αυτών λάμβανε χώρα επί 24 και 48 ώρες, κατά τα γνωστά.

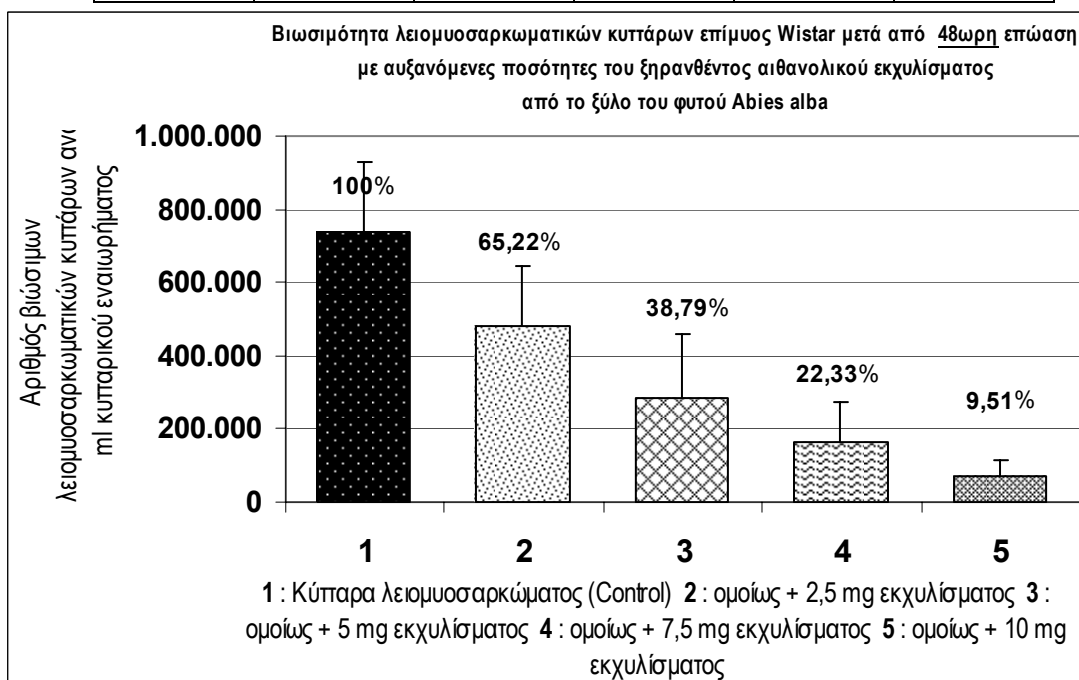
Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι και στην περίπτωση των εκχυλισμάτων του ξύλου έχουμε κυτταροτοξική δράση, η οποία όμως εκδηλώνεται με σαφήνεια στις μεγάλες δόσεις. Οι δράσεις των διαφόρων δόσεων εκχυλίσματος ξύλου *Abies alba* φαίνονται στα διαγράμματα 26 – 27 και στο συγκεντρωτικό διάγραμμα 28. Οι δράσεις αυτές αναφέρονται στις επωάσεις των 48 ωρών, στις οποίες είναι σαφέστερες εν συγκρίσει προς τις αντίστοιχες που εμφανίζονται με την 24ωρη επώαση.

	Control	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	1.065.000	908.750	855.000
SD	88.388	61.872	98.995



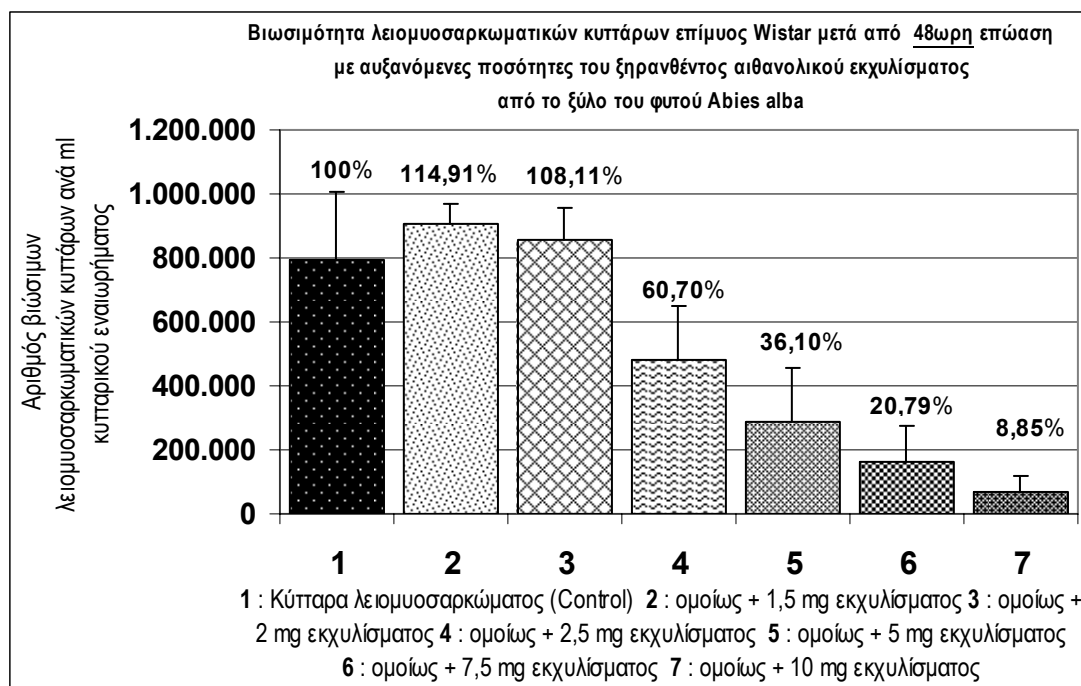
Διάγραμμα 26

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	736.000	480.000	285.500	164.375	70.000
SD	193.309	167.489	173.443	110.045	47.081



Διάγραμμα 27

	Control	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	790.833	908.750	855.000	480.000	285.500	164.375	70.000
SD	218.368	61.872	98.995	167.489	173.443	110.045	47.081



Διάγραμμα 28

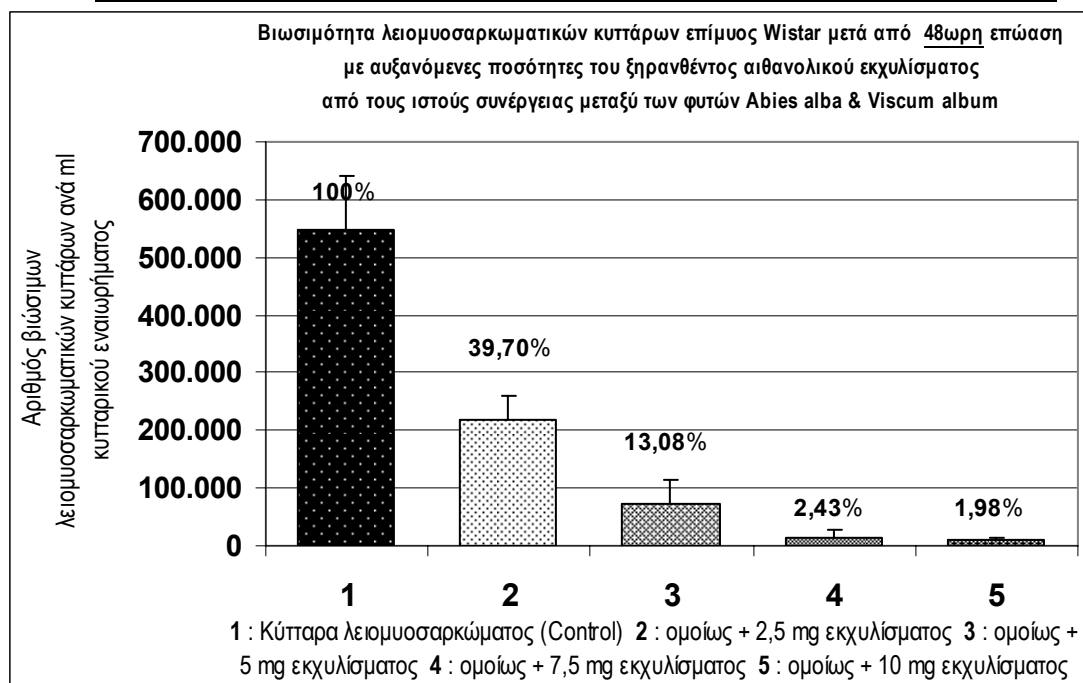
Γενικά η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων του ξύλου του *Abies* είναι μικρότερη εν συγκρίσει με εκείνη που εμφανίζουν τα ίσου βάρους εκχυλίσματα των φλοιών και φύλλων του εν λόγω φυτού. Επίσης η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων του ξύλου είναι μικρότερη από αυτήν που επιδεικνύουν τα ίσου βάρους εκχυλίσματα των φύλλων, φλοιών και καρπών του *Viscum album*. Συνεπώς, στην δομή του ξύλου ή κάποιοι κυτταροτοξικοί παράγοντες πρέπει να λείπουν ή να είναι απλώς αραιωμένοι.

Β(4). Δράση εκχυλίσματος συνέργιας *Abies alba* και *Viscum album*.

Η δράση του εκχυλίσματος της συνέργιας των ιστών των δύο φυτών μελετήθηκε όπως και στα προηγούμενα φυτικά εκχυλίσματα. Τα δεδομένα από την μελέτη των δράσεων στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα δείχνουν ότι το εκχύλισμα της συνέργιας εμφανίζει κυτταροτοξικότητα, ανάλογη του ξύλου του *Abies alba*, αλλά λίγο ισχυρότερη, χωρίς ωστόσο να λαμβάνει την τιμή κυτταροτοξικότητας που εμφανίζει ο βλαστός του *Viscum album*. Συνεπώς η ζώνη της συνέργιας αποτελεί και μια περιοχή στην οποία η συγκέντρωση των κυτταροτοξικών παραγόντων έχει ενδιάμεσες τιμές, μεταξύ της ελάχιστης του ξύλου του *Abies alba* και των ιστών του βλαστού του *Viscum album*. Στο διάγραμμα 29 φαίνεται η κυτταροτοξικότητα των μεγάλων δόσεων

εκχυλίσματος συνέργειας, κατόπιν επώασης των δόσεων αυτών με λειομοσοαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar επί 48 ώρες.

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	547.917	217.500	71.667	13.333	10.833
SD	92.566	40.927	41.558	12.829	3.819



Διάγραμμα 29

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ (COCKTAILS) ΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Abies alba* + *Viscum album*.

Όπως αναφέρουμε και στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων, τα πειράματα αυτά περιλαμβάνουν την χορήγηση ενός μίγματος προερχομένου από την ανάμιξη ίσων ποσοτήτων εκχυλισμάτων, για το μεν *Viscum album* βλαστού και φύλλων, για το δε *Abies alba* φλοιού και φύλλων, δηλαδή των πιο δραστικών τμημάτων, όπως προκύπτουν από τα προηγούμενα διαγράμματα, των δύο φυτών.

Για να υπάρξει συγκρισιμότητα των πειραμάτων (σε ό,τι αφορούσε τις ποσότητες ξηρού υλικού από τα εκχυλίσματα) με τα πειράματα τα σχετικά με τα επί μέρους εκχυλίσματα των ιστών του *Viscum album* και του *Abies alba* χρησιμοποιήθηκαν δύο σχήματα δόσεων, το σχήμα χαμηλών δόσεων που περιλάμβανε τις ποσότητες των 0,5 mg – 1,0 mg – 1,5 mg και 2,0 mg ξηρού συνολικού εκχυλίσματος και το σχήμα υψηλών δόσεων που περιλάμβανε τις

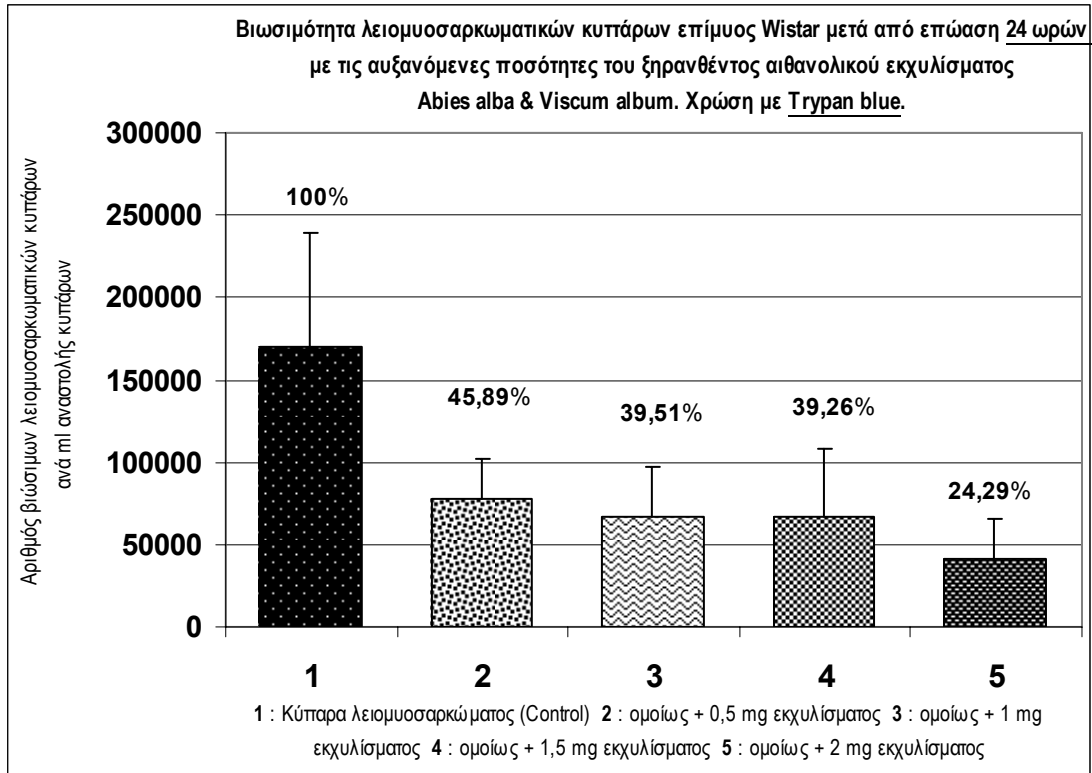
ποσότητες των 2,5 mg – 5 mg – 7,5 mg και 10 mg του ιδίου ξηρού μικτού εκχυλίσματος. Κάθε μια από τις ανωτέρω ποσότητες εκχυλίσματος χορηγούταν σε ένα αριθμό τρυβλίων και τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επωαζόταν επί 24 και 48 ώρες, προκειμένου να προσδιοριστεί η κυτταροτοξική δράση αυτής.

Τα δεδομένα δείχνουν, όπως αναμενόταν, μια αναλογία στις δράσεις των μικτών εκχυλισμάτων, με τις αντίστοιχες δράσεις των επί μέρους εκχυλισμάτων των δύο φυτών. Δηλαδή η δράση του μικτού εκχυλίσματος (cocktail) δεν απέχει ποσοτικά ιδιαίτερα από την δράση του εκχυλίσματος ενός συγκεκριμένου ιστού των δύο συνεργούντων φυτών.

Σημειώνουμε επίσης, ότι οι δράσεις των εκχυλισμάτων των φύλλων και του βλαστού του *Viscum album*, δεν παρουσίαζαν ιδιαίτερη ποσοτική διαφοροποίηση από τις δράσεις των εκχυλισμάτων του φλοιού και των φύλλων του *Abies alba*, όπως αναφέραμε παραπάνω και όπως εμφανίζεται στον πίνακα 2, όπου παρατίθενται οι IC₅₀ των εκχυλισμάτων όλων των ιστών κάθε φυτού ξεχωριστά, όπως επίσης και των μικτών εκχυλισμάτων. Επίσης στον ίδιο πίνακα παρατίθενται οι ελάχιστες θανατηφόρες συγκεντρώσεις (MLC) όλων των εκχυλισμάτων κάθε ιστού των δύο φυτών, όπως και των μικτών εκχυλισμάτων. Οι δύο πίνακες αναφέρονται στις 24 και 48 ώρες επώασης.

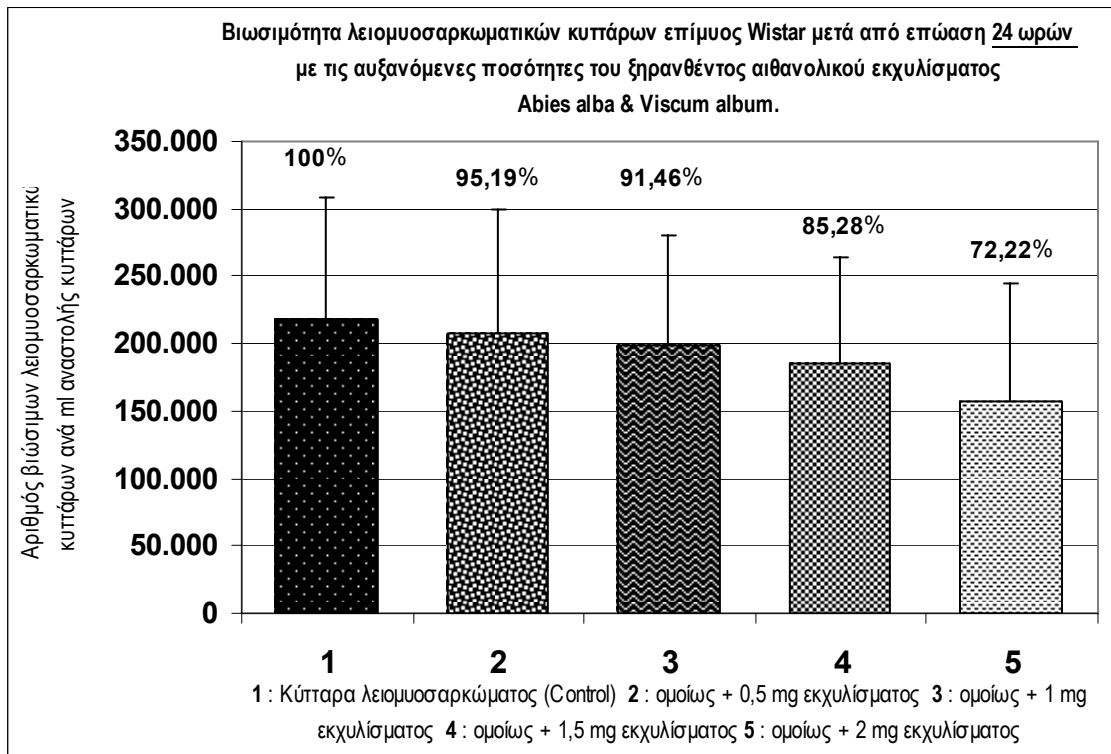
Οι μετρήσεις της βιωσιμότητας των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων έγινε με δύο μεθόδους: α) με χρώση των κυττάρων δια της μεθόδου Trypan blue (διαγράμματα 30 – 32 – 34 – 36) και β) χωρίς χρώση των κυττάρων (διαγράμματα 31 – 33 – 35 – 37). Γενικά τα αποτελέσματα των 24ωρων και 48ωρων επώασεων με τις επιλεγθείσες δόσεις εκχυλισμάτων δείχνονται για τις μεν μικρές δόσεις (0,5 mg – 1,0 mg – 1,5 mg και 2,0 mg) – στα διαγράμματα 30 – 31 – 32 – 33 για τις δε μεγάλες δόσεις (2,5 mg – 5 mg – 7,5 mg – 10 mg) στα διαγράμματα 34 – 35 – 36 – 37, όπως φαίνονται παρακάτω.

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	169.792	77.917	67.083	66.667	41.250
SD	69.890	24.363	30.142	41.883	24.887



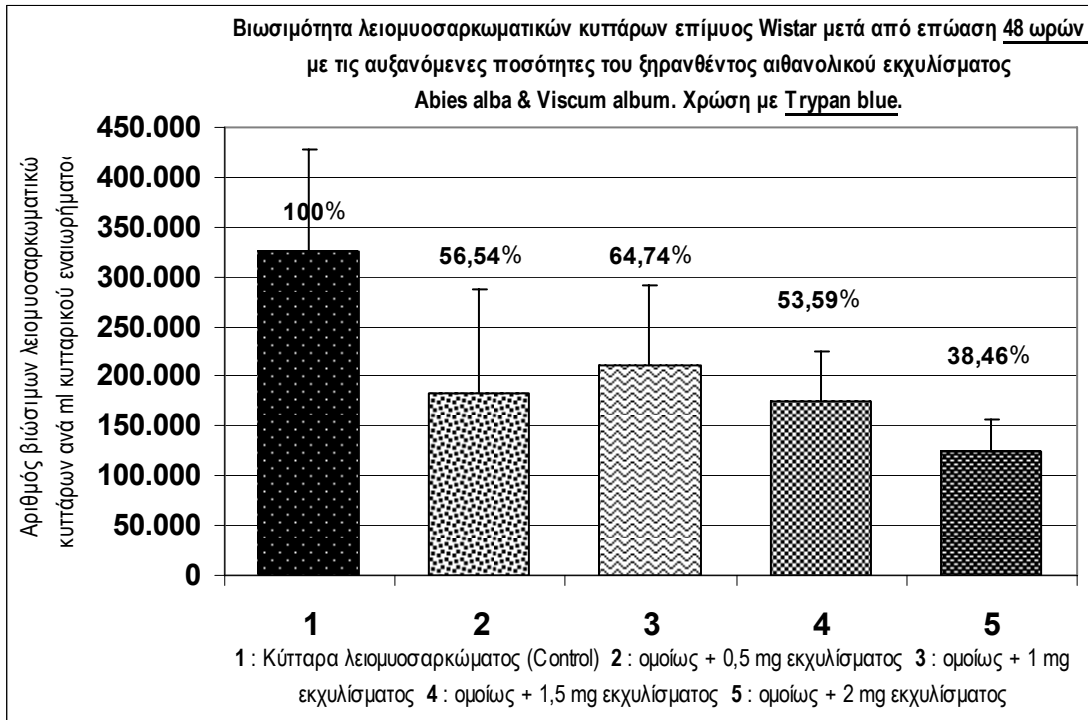
Διάγραμμα 30

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	217.656	207.188	199.063	185.625	157.188
SD	91.111	91.704	81.130	78.896	87.785



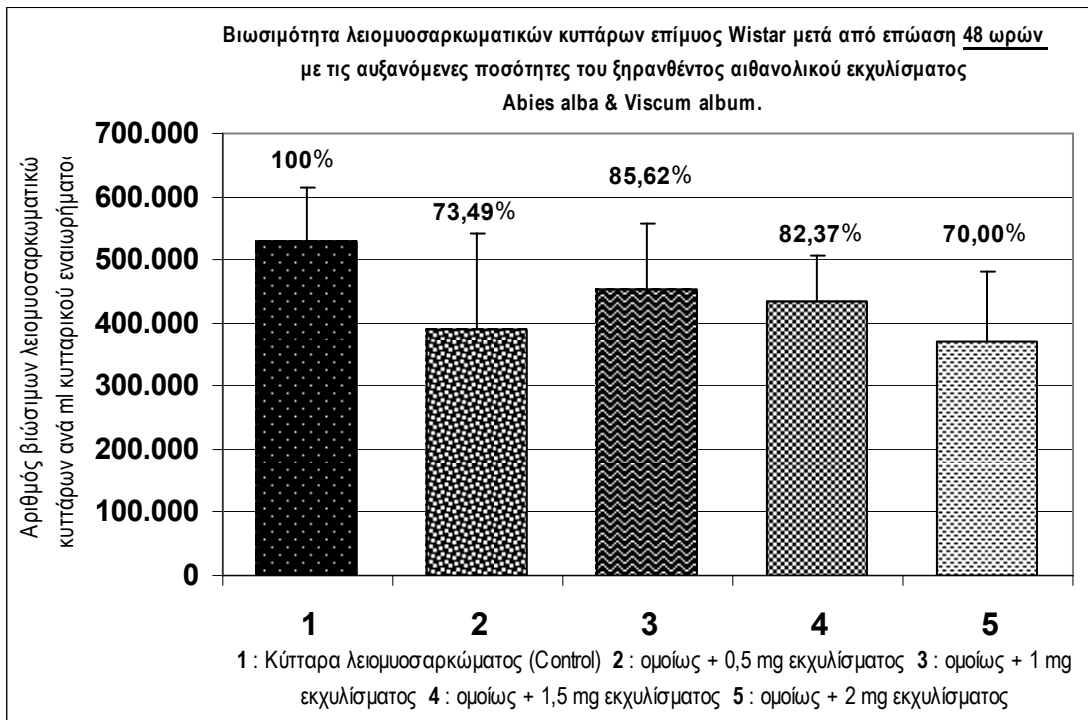
Διάγραμμα 31

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	325.000	183.750	210.417	174.167	125.000
SD	102.175	102.807	81.262	50.957	30.822



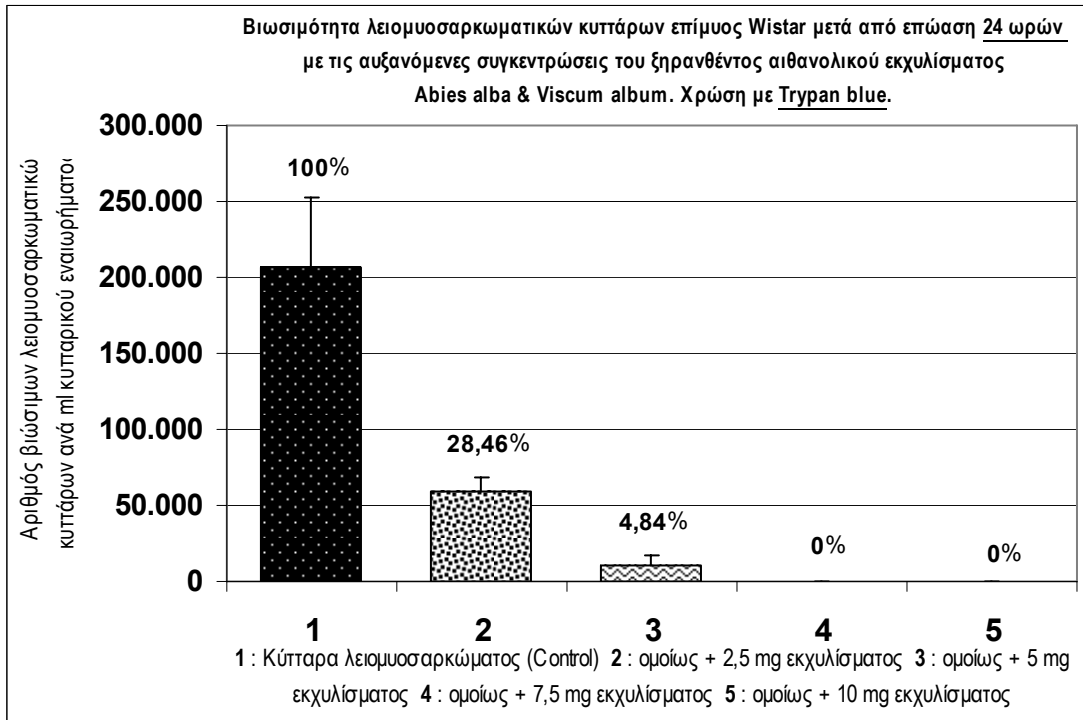
Διάγραμμα 32

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	528.125	388.125	452.188	435.000	369.688
SD	86.639	153.749	106.858	71.888	110.861



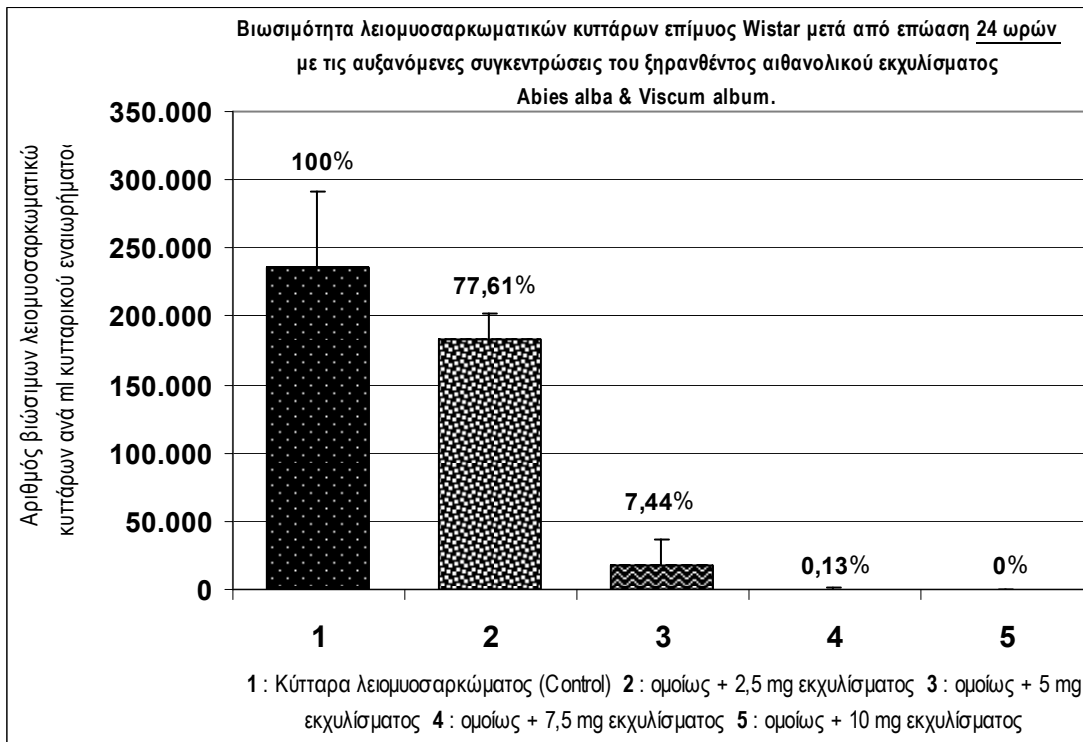
Διάγραμμα 33

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	206.458	58.750	10.000	0	0
SD	45.670	9.842,50	6.519	0	0



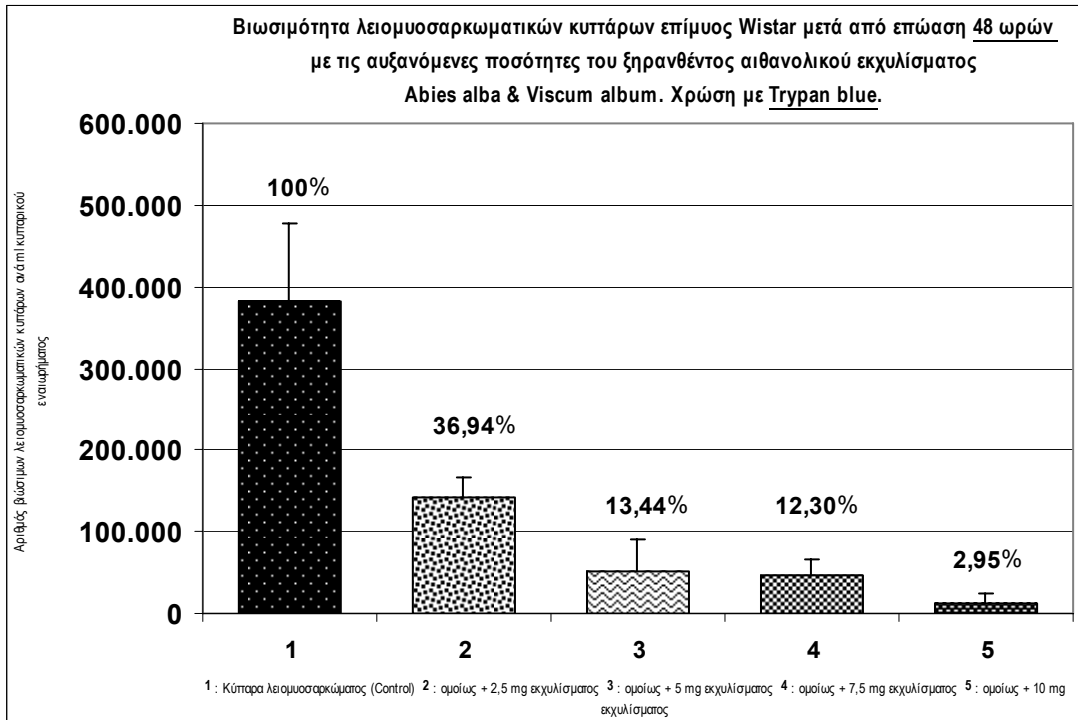
Διάγραμμα 34

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	235.156	182.500	17.500	313	0
SD	56.061	20.045	19.226	884	0



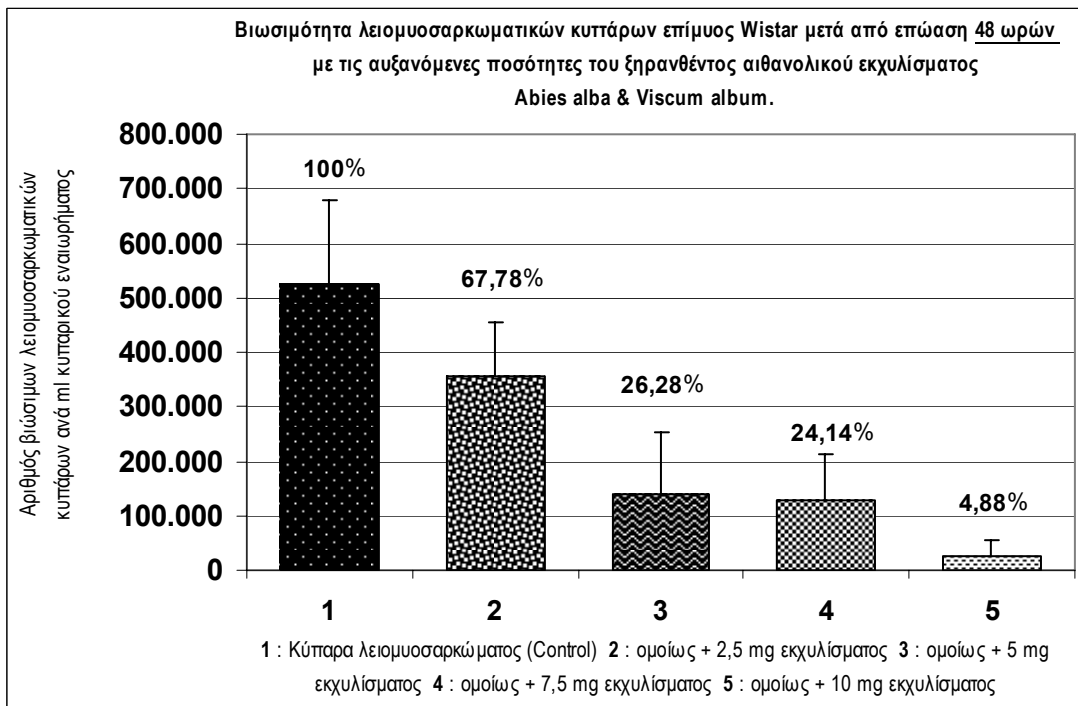
Διάγραμμα 35

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	381.250	140.833	51.250	46.875	11.250
SD	97.220	26.677	38.300	19.619	12.666



Διάγραμμα 36

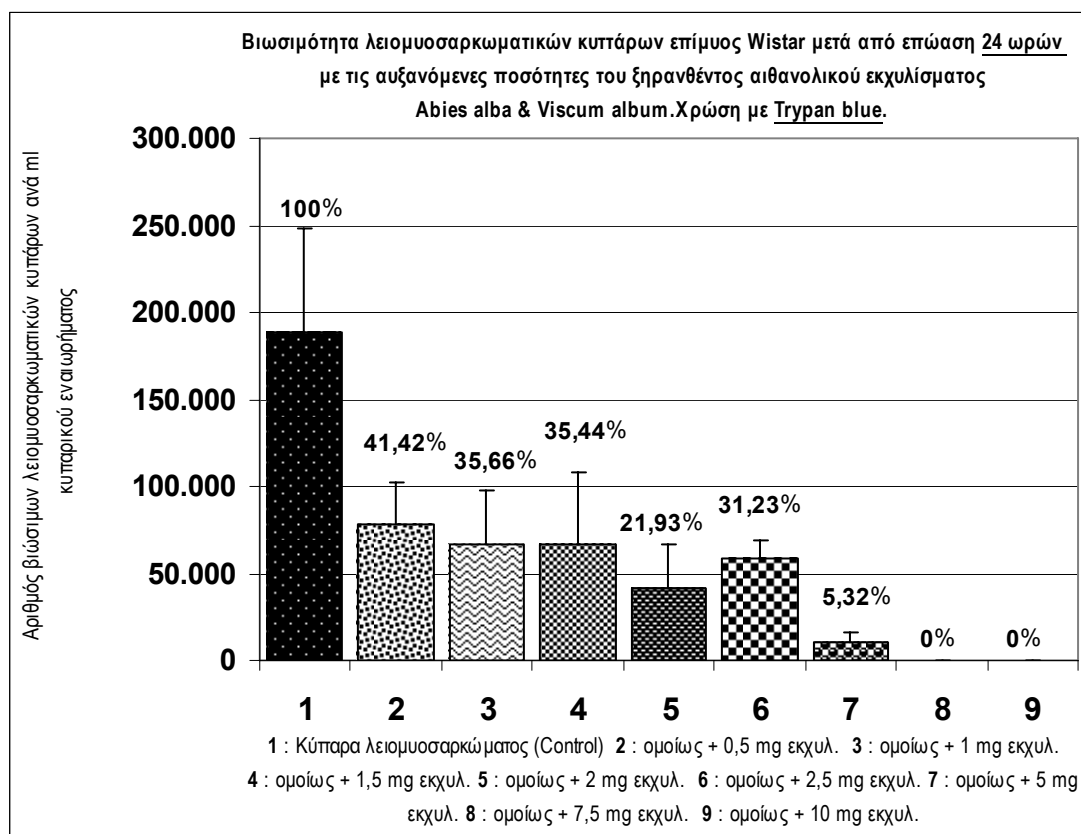
	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	525.625	356.250	138.125	126.875	25.625
SD	151.909	98.986	113.976	85.636	30.873



Διάγραμμα 37

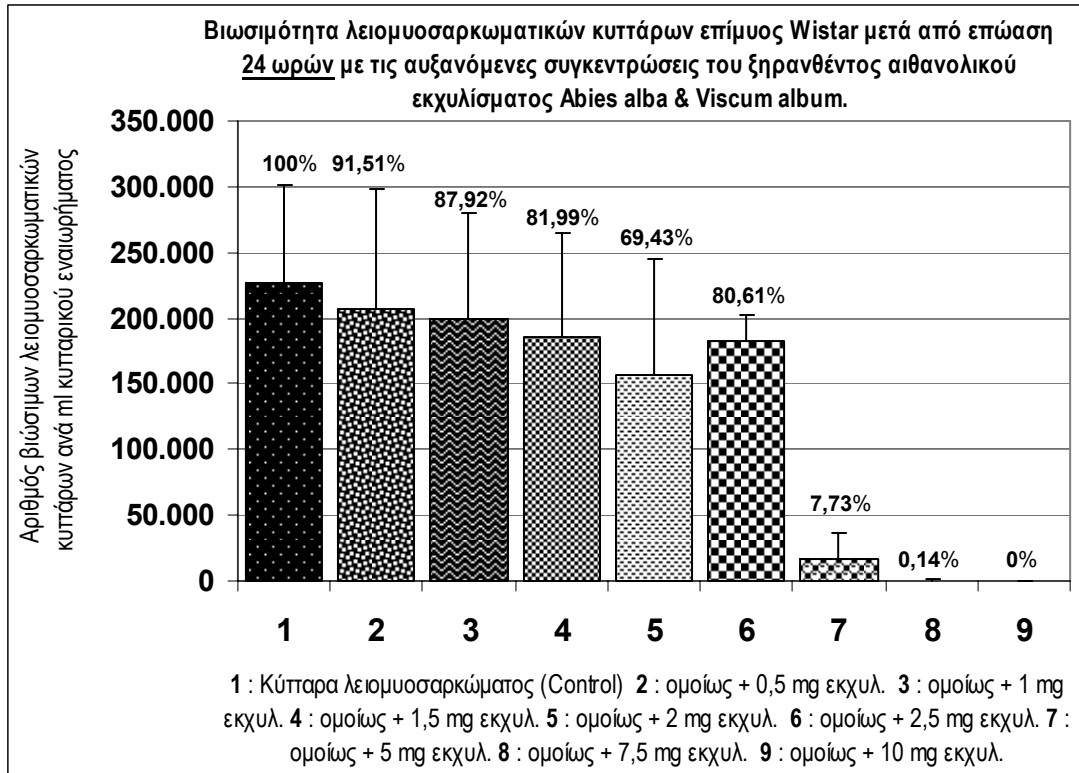
Τα συγκεντρωτικά διαγράμματα που ακολουθούν, των 24 ωρών (διαγράμματα 38 και 39) και 48 ωρών (διαγράμματα 40 και 41) επώασης των λειομοσοσαρκωματικών κυττάρων, με όλες τις δόσεις του cocktail εκχυλίσματος (από την ανάμειξη των πιο δραστικών φυτικών τμημάτων των δύο υπό μελέτη φυτών), αναφέρονται στη μέτρηση της βιωσιμότητας των LMS κυττάρων α) με χρώση των κυττάρων δια της μεθόδου Trypan blue (διαγράμματα 38 και 40) και β) χωρίς χρώση (διαγράμματα 39 και 41).

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	188.125	77.917	67.083	66.667	41.250	58.750	10.000	0	0
SD	60.699	24.363	30.142	41.883	24.887	9.843,00	6.519	0	0



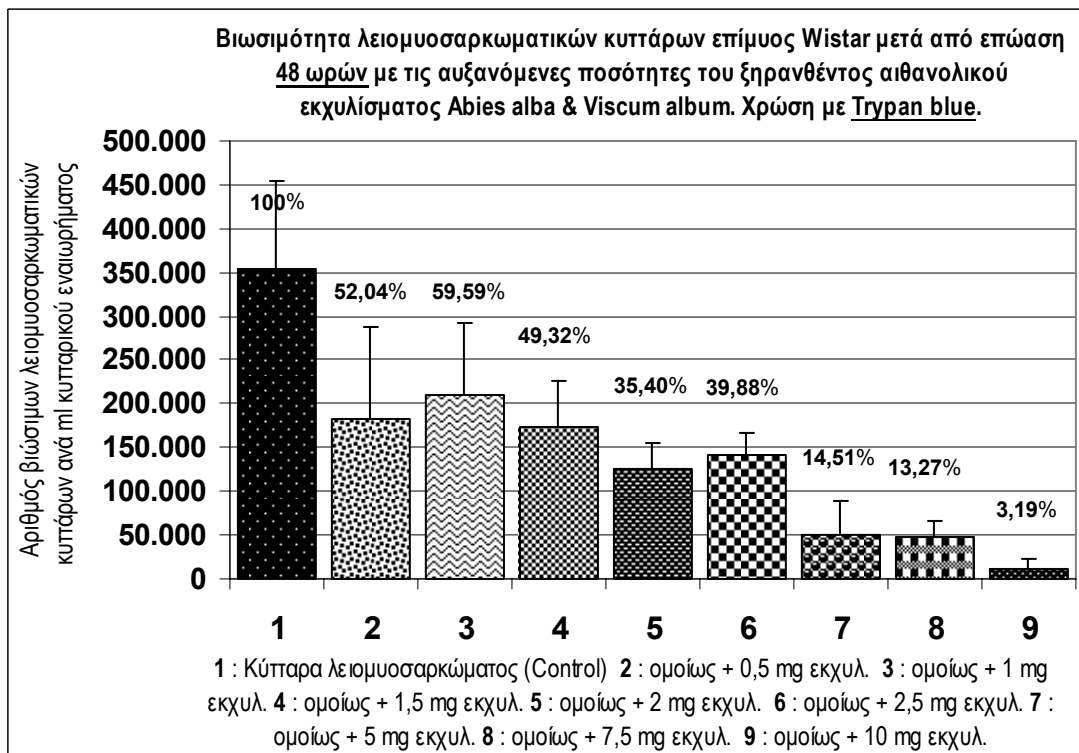
Διάγραμμα 38

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	226.406	207.188	199.063	185.625	157.188	182.500	17.500	313	0
SD	74.943	91.704	81.130	78.896	87.785	20.045	19.226	884	0



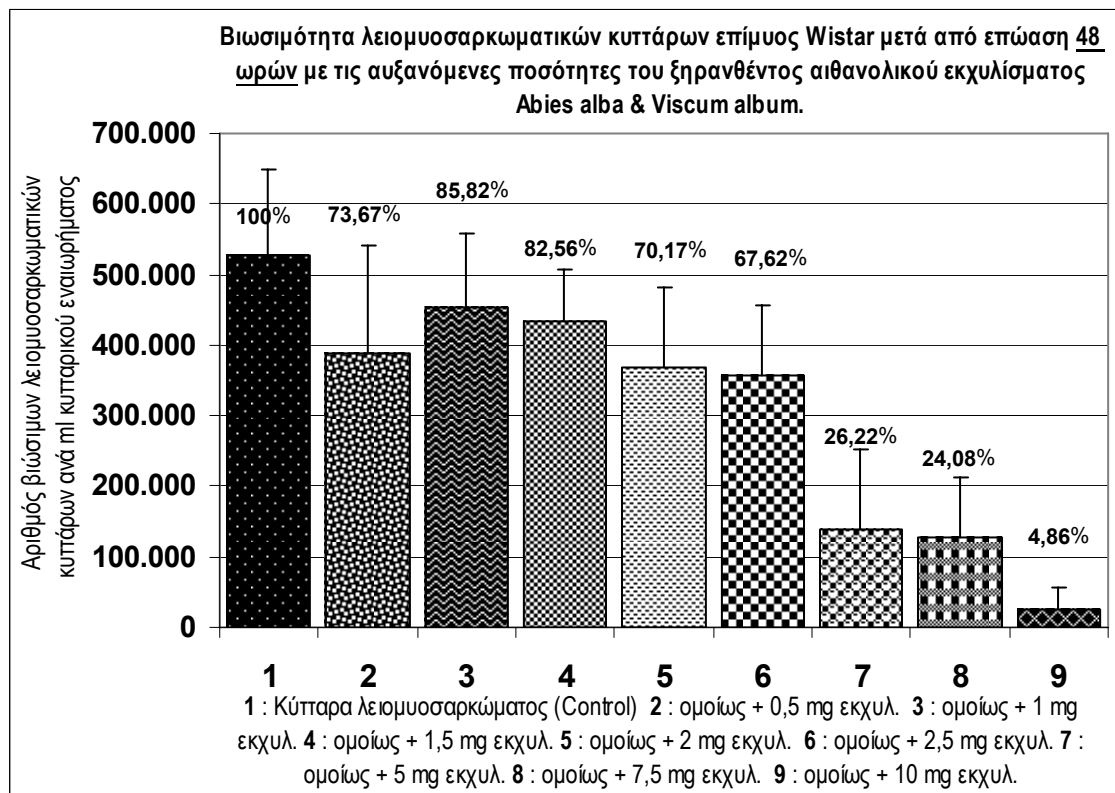
Διάγραμμα 39

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	353.125	183.750	210.417	174.167	125.000	140.833	51.250	46.875	11.250
SD	101.680	102.807	81.262	50.957	30.822	26.677	38.300	19.619	12.666



Διάγραμμα 40

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	526.875	388.125	452.188	435.000	369.688	356.250	138.125	126.875	25.625
SD	121.654	153.749	106.858	71.888	110.861	98.986	113.976	85.636	30.873

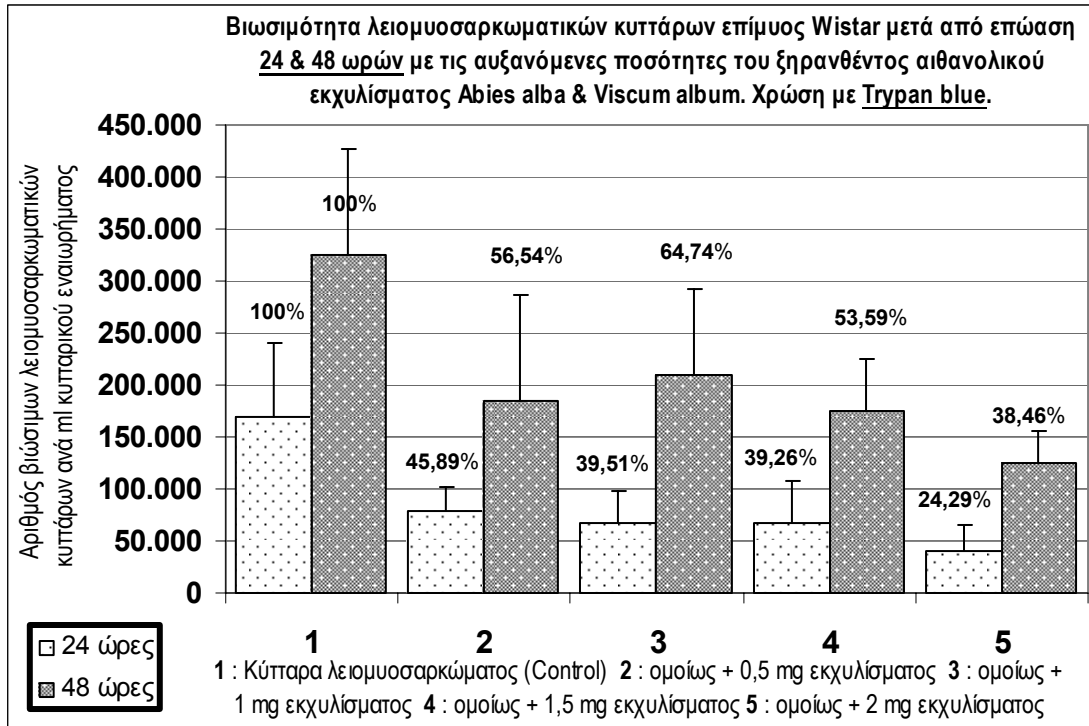


Διάγραμμα 41

Τα διαγράμματα 42 (με χρώση Trypan blue) και 43 (χωρίς χρώση) αντιπαραβάλλουν δύο σειρές πειραμάτων με χαμηλές δόσεις εκχυλίσματος (0,5 mg – 1,0 mg – 1,5 mg και 2,0 mg) στις 24 και 48 ώρες επώασης των λειμοσορκωματικών κυττάρων.

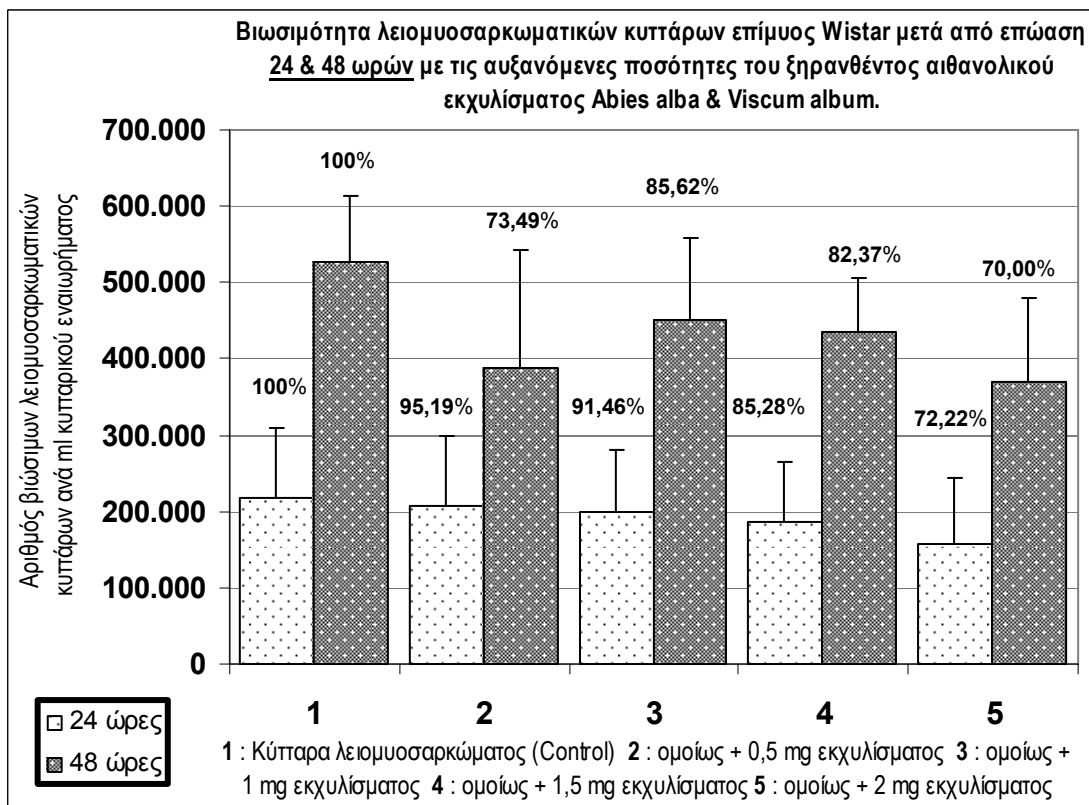
Επίσης τα διαγράμματα 44 (με χρώση Trypan blue) και 45 (χωρίς χρώση) αντιπαραβάλλουν δύο σειρές πειραμάτων με υψηλές δόσεις εκχυλίσματος (2,5 mg – 5,0 mg – 7,5 mg και 10 mg) στις 24 και 48 ώρες επώασης των λειμοσορκωματικών κυττάρων.

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	169.792	77.917	67.083	66.667	41.250	325.000	183.750	210.417	174.167	125.000
SD	69.890	24.363	30.142	41.883	24.887	102.175	102.807	81.262	50.957	30.822



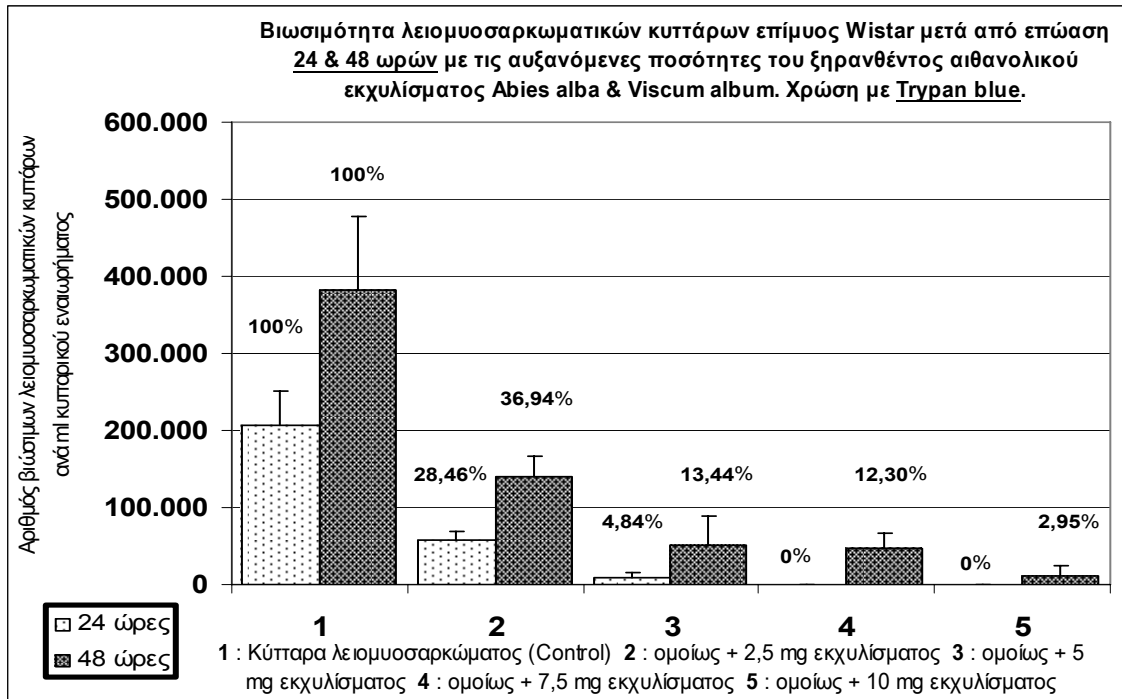
Διάγραμμα 42

	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg	Control	0,5 mg	1 mg	1,5 mg	2 mg
AVERAGE	217.656	207.188	199.063	185.625	157.188	528.125	388.125	452.188	435.000	369.688
SD	91.111	91.704	81.130	78.896	87.785	86.639	153.749	106.858	71.888	110.861



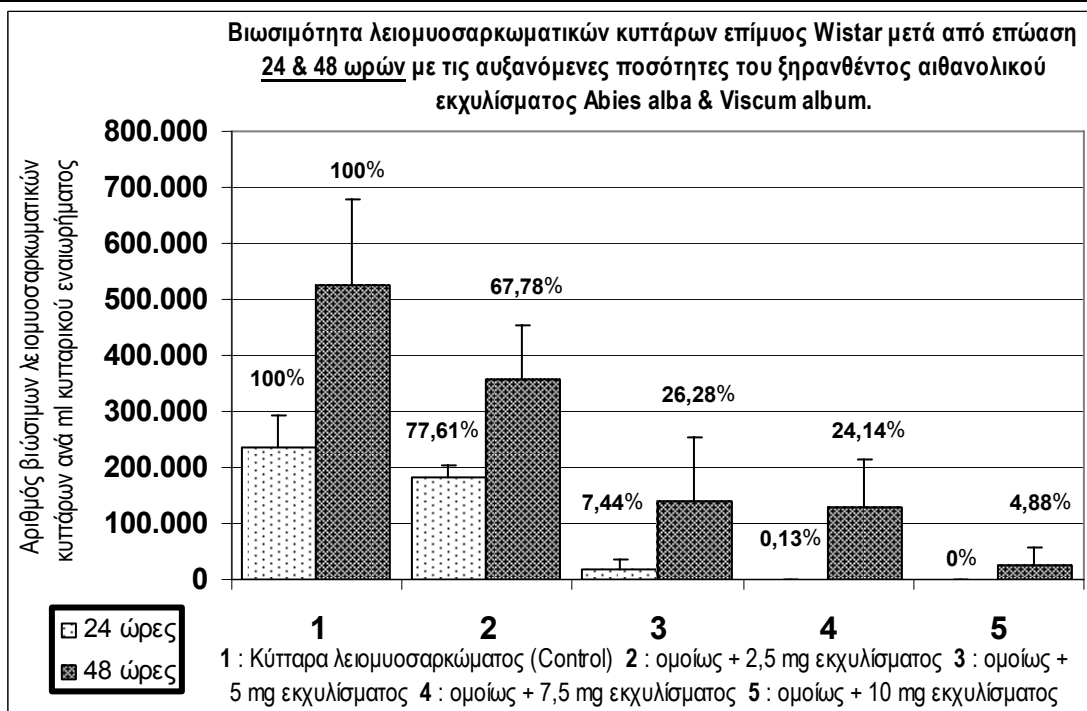
Διάγραμμα 43

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	206.458	58.750	10.000	0	0	381.250	140.833	51.250	46.875	11.250
SD	45.670	9.842,50	6.519	0	0	97.220	26.677	38.300	19.619	12.666



Διάγραμμα 44

	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg	Control	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
AVERAGE	235.156	182.500	17.500	313	0	525.625	356.250	138.125	126.875	25.625
SD	56.061	20.045	19.226	884	0	151.909	98.986	113.976	85.636	30.873



Διάγραμμα 45

Πίνακας 2: Πίνακας ενδείξεων IC₅₀ και ολικού θανάτου των LMS κυττάρων απ' τη δράση εκχυλισμάτων τμημάτων των φυτών *Abies alba* & *Viscum album*.

ΦΥΤΟ: Abies alba		ΤΜΗΜΑ: Φύλλο	ΦΥΤΟ: V. album		ΤΜΗΜΑ: Φύλλο
	IC₅₀	MLC		IC₅₀	MLC
24 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	5 mg εκχ.	24 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	> 5 mg εκχ.
48 ώρες	2 - 2,5 mg εκχ.	5 mg εκχ.	48 ώρες	1 - 1,5 mg εκχ.	5 mg εκχ.
ΦΥΤΟ: Abies alba		ΤΜΗΜΑ: Φλοιός	ΦΥΤΟ: V. album		ΤΜΗΜΑ: Βλαστός
	IC₅₀	MLC		IC₅₀	MLC
24 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	> 5 mg εκχ.	24 ώρες	> 2,5 mg εκχ.	> 7,5 mg εκχ.
48 ώρες	1,5 - 2 mg εκχ.	> 5 mg εκχ.	48 ώρες	2 - 2,5 mg εκχ.	> 5 mg εκχ.
ΦΥΤΟ: Abies alba		ΤΜΗΜΑ: Ξύλο	ΦΥΤΟ: V. album		ΤΜΗΜΑ: Καρπός
	IC₅₀	MLC		IC₅₀	MLC
24 ώρες	—	—	24 ώρες	—	—
48 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	> 10 mg εκχ.	48 ώρες	> 7,5 mg εκχ.	>> 10 mg εκχ.
ΦΥΤΟ: A. alba + V. album		Συνέργεια	IC ₅₀ : Inhibitory Concentration 50% MLC: Minimum Lethal Concentration		
	IC₅₀	MLC			
24 ώρες	—	—			
48 ώρες	< 2,5 mg εκχ.	> 10 mg εκχ.			
ΦΥΤΟ: A. alba + V. album		Cocktail	ΦΥΤΟ: A. alba + V. album		Cocktail
ΧΩΡΙΣ ΧΡΩΣΗ			TRYPAN BLUE		
	IC₅₀	MLC		IC₅₀	MLC
24 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	> 7,5 mg εκχ.	24 ώρες	< 0,5 mg εκχ.	> 5 mg εκχ.
48 ώρες	2,5 - 5 mg εκχ.	> 10 mg εκχ.	48 ώρες	1,5 mg εκχ.	> 10 mg εκχ.

Στον παραπάνω πίνακα 2 συγκρίνουμε τις IC_{50} όλων των εκχυλισμάτων για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής ισχύος καθ' ενός εξ αυτών και για την κατάδειξη του δραστικότερου. Επίσης στον ίδιο πίνακα παρουσιάζουμε τις ελάχιστες δόσεις εκχυλίσματος που επιφέρουν θάνατο 100 % στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του τρυβλίου. Από αυτά φαίνεται ότι ο πράσινος φλοιός του *Abies alba* είναι μάλλον η ισχυρότερη πηγή κυτταροτοξικότητας μεταξύ των υπολοίπων ιστών των δύο φυτών που μελετήσαμε.

Δ(1). ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Όπως προαναφέραμε στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων η χρόνια τοξικότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* και *Abies alba* μελετήθηκε επί ωρίμων επίμυων Wistar και των δύο φύλων.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 28 φυσιολογικοί επίμυες Wistar ηλικίας 6 μηνών, οι οποίοι είχαν περατώσει την σωματική τους ανάπτυξη. Η ομάδα των εν λόγω επίμυων περιλάμβανε ισάριθμες υποομάδες θηλυκών και αρσενικών ατόμων, προερχομένων από κοινούς προπάτορες.

Τα ζώα παρακολουθήθηκαν επί 42 ημέρες, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν υπάρχει ουσιαστική σωματική αύξηση και εν συνεχεία διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.) και την Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.). Κατόπιν στα μεν ζώα της Ο.Ε. αρχίσαμε να χορηγούμε ενδοπεριτοναϊκώς μια ποσότητα 2 ml φυσιολογικού ορού, ενώ στα ζώα της ομάδας χρόνιας τοξικότητας αρχίσαμε την χορήγηση μιας ποσότητας εκχυλίσματος 152,8 mg / kg b.w διαλυμένης σε φυσιολογικό ορό ίσης ποσότητας με εκείνη την οποία χορηγούσαμε σε κάθε ένα ζώο της ομάδας ελέγχου.

Δεδομένου ότι οι διακυμάνσεις των σωματικών βαρών ήσαν μικρές δεν προσαρμόσαμε την δοσολογία του εκχυλίσματος στο σωματικό βάρος του κάθε ζώου.

Η χορήγηση του εκχυλίσματος διήρκεσε συνολικά 65 ημέρες. Τις πρώτες 10 ημέρες χορηγήθηκε ανά ημέρα μια ποσότητα 152,8 mg / kg b.w. εκχυλίσματος, ενώ τις υπόλοιπες 55 ημέρες χορηγήσαμε σταδιακά

αυξανόμενες ποσότητες εκχυλίσματος οι οποίες ήσαν: 305,56 mg / kg b.w. / day (7 μέρες), 458,32 mg /kg b.w./ day (20 ημέρες) και 916,68 mg / kg b.w./ day (28 ημέρες). Τα ζώα ζυγίστηκαν πριν την έναρξη της χορήγησης και κατόπιν ζυγίζονταν μια φορά ανά δέκα ημέρες. Επίσης κυκλικά τοποθετούνταν σε μεταβολικούς κλωβούς και γινόταν καταγραφή του πόσιμου ύδατος, της καταναλισκόμενης ποσότητας τροφής καθώς και της ποσότητας των αποβαλλόμενων απεκκριμάτων τους, ανά 24ωρο. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα εν λόγω πειράματα έχουν ως εξής:

1^{ov}) Οι διακυμάνσεις του βάρους των ζώων κατά την διάρκεια της παρακολούθησης χωρίς την λήψη του εκχυλίσματος των δύο φυτών, είναι εξαιρετικά μικρές και υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη των πειραματόζωων έχει περατωθεί.

2^{ov}) Η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος (το οποίο έχει υποβληθεί σε ξήρανση με ρεύμα αζώτου, ανασύσταση σε φυσιολογικό ορό και διήθηση με φίλτρα κατακράτησης μικροβίων) δεν επιφέρει στατιστικώς σημαντική μεταβολή στο ολικό βάρος σώματος των πειραματόζωων, όπως επίσης και στα επί μέρους βάρη των σπλάχνων αυτών καθώς και του εγκεφάλου.

3^{ov}) Η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος δεν επέφερε θάνατο σε κανένα από τα πειραματόζωα στα οποία χορηγούταν δια ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης επί 65 ημέρες.

4^{ov}) Οι αιματολογικοί έλεγχοι των ζώων που διενεργήθηκαν πριν την έναρξη και μετά το πέρας των 65 ημερών χορήγησης του εκχυλίσματος δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές των έμμορφων στοιχείων του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια), της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη.

5^{ov}) Ο παθολογοανατομικός έλεγχος των σπλάχνων των πειραματόζωων δεν έδειξε παθολογικές αλλοιώσεις αυτών, εν σχέση προς την ομάδα ελέγχου.

6^{ov}) Τα αιμοπετάλια των πειραματόζωων παρουσίασαν μια τάση επιβράδυνσης της συσσώρευσης αυτών και μείωσης του ύψους συσσώρευσης, όπως επίσης του μεγέθους των θρόμβων, αλλά παρέμειναν λειτουργικά.

Πίνακας 3: Βάρη ζώων ομάδας ελέγχου (Ο.Ε.) στο πείραμα χρόνιας τοξικότητας, του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Abies alba* & *Viscum album*, σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Χωρίς εκχύλισμα		Χωρίς εκχύλισμα		Χωρίς εκχύλισμα	
ΕΛΕΓΧΟΣ	βάρος g	ΕΛΕΓΧΟΣ	βάρος g	ΕΛΕΓΧΟΣ	βάρος g
K ₄ Z ₁ - ♂	244,36	K ₄ Z ₁ - ♂	254,69	K ₄ Z ₁ - ♂	263,44
K ₄ Z ₂ - ♂	293,67	K ₄ Z ₂ - ♂	309,50	K ₄ Z ₂ - ♂	319,80
K ₄ Z ₃ - ♂	359,70	K ₄ Z ₃ - ♂	375,30	K ₄ Z ₃ - ♂	379,90
K ₅ Z ₁ - ♂	322,90	K ₅ Z ₁ - ♂	321,90	K ₅ Z ₁ - ♂	340,20
K ₅ Z ₂ - ♂	357,00	K ₅ Z ₂ - ♂	371,40	K ₅ Z ₂ - ♂	348,60
K ₆ Z ₁ - ♂	250,52	K ₆ Z ₁ - ♂	251,75	K ₆ Z ₁ - ♂	283,85
K ₆ Z ₂ - ♂	290,71	K ₆ Z ₂ - ♂	291,50	K ₆ Z ₂ - ♂	329,00
K ₁₀ Z ₁ - ♀	212,11	K ₁₀ Z ₁ - ♀	221,53	K ₁₀ Z ₁ - ♀	237,61
K ₁₀ Z ₂ - ♀	191,53	K ₁₀ Z ₂ - ♀	199,31	K ₁₀ Z ₂ - ♀	207,84
K ₁₀ Z ₃ - ♀	223,37	K ₁₀ Z ₃ - ♀	229,58	K ₁₀ Z ₃ - ♀	242,67
K ₁₁ Z ₁ - ♀	187,65	K ₁₁ Z ₁ - ♀	214,30	K ₁₁ Z ₁ - ♀	228,31
K ₁₁ Z ₂ - ♀	194,65	K ₁₁ Z ₂ - ♀	212,78	K ₁₁ Z ₂ - ♀	230,62
K ₁₂ Z ₁ - ♀	184,81	K ₁₂ Z ₁ - ♀	224,46	K ₁₂ Z ₁ - ♀	230,98
K ₁₂ Z ₂ - ♀	211,20	K ₁₂ Z ₂ - ♀	183,90	K ₁₂ Z ₂ - ♀	191,20
Average	251,7271	Average	261,5642857	Average	273,85857
SD	62,40196	SD	62,32747	SD	59,389337

Στον παραπάνω πίνακα 3 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές μεταβολές του βάρους των ζώων επί χρονικό διάστημα 107 ημερών. Η πρώτη αριστερά καταγραφή έλαβε χώρα στην αρχή του πειράματος, η δεύτερη μετά από 42 ημέρες και η τελευταία μετά από 107 ημέρες από την έναρξη των καταγραφών.

Στον επόμενο πίνακα 4 φαίνεται η μεταβολή των σωματικών βαρών των ζώων της Ομάδας Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.), κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε συνολικό χρόνο πειραματισμού 107 ημερών. Η πρώτη στήλη περιλαμβάνει τα βάρη πριν την έναρξη της χορήγησης του μικτού εκχυλίσματος, η δεύτερη 42 μέρες μετά και η τελευταία αμέσως μετά την λήξη της χορήγησης του εκχυλίσματος, η οποία διήρκεσε 65 ημέρες.

Πίνακας 4: Βάρη ζώων Ομάδας Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.), του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Abies alba* & *Viscum album*, σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Έναρξη πειραματισμού		Μετά από 42 ημέρες χωρίς χορήγηση		Μετά από 65 ημέρες χορήγησης εκχυλίσματος	
Ο.Χ.Τ.	βάρος g	Ο.Χ.Τ.	βάρος g	Ο.Χ.Τ.	βάρος g
K ₁ Z ₁ - ♂	262,42	K ₁ Z ₁ - ♂	272,63	K ₁ Z ₁ - ♂	176,00
K ₁ Z ₂ - ♂	266,66	K ₁ Z ₂ - ♂	264,86	K ₁ Z ₂ - ♂	292,11
K ₁ Z ₃ - ♂	262,58	K ₁ Z ₃ - ♂	261,80	K ₁ Z ₃ - ♂	285,17
K ₂ Z ₁ - ♂	320,70	K ₂ Z ₁ - ♂	337,00	K ₂ Z ₁ - ♂	345,50
K ₂ Z ₂ - ♂	321,90	K ₂ Z ₂ - ♂	343,70	K ₂ Z ₂ - ♂	356,50
K ₃ Z ₁ - ♂	308,56	K ₃ Z ₁ - ♂	314,10	K ₃ Z ₁ - ♂	322,80
K ₃ Z ₂ - ♂	304,60	K ₃ Z ₂ - ♂	283,48	K ₃ Z ₂ - ♂	309,70
K ₇ Z ₁ - ♀	222,54	K ₇ Z ₁ - ♀	221,36	K ₇ Z ₁ - ♀	227,84
K ₇ Z ₂ - ♀	221,48	K ₇ Z ₂ - ♀	221,15	K ₇ Z ₂ - ♀	221,15
K ₇ Z ₃ - ♀	216,70	K ₇ Z ₃ - ♀	229,33	K ₇ Z ₃ - ♀	236,80
K ₈ Z ₁ - ♀	196,10	K ₈ Z ₁ - ♀	195,64	K ₈ Z ₁ - ♀	192,45
K ₈ Z ₂ - ♀	214,40	K ₈ Z ₂ - ♀	215,90	K ₈ Z ₂ - ♀	223,70
K ₉ Z ₁ - ♀	201,05	K ₉ Z ₁ - ♀	225,44	K ₉ Z ₁ - ♀	234,07
K ₉ Z ₂ - ♀	196,94	K ₉ Z ₂ - ♀	210,07	K ₉ Z ₂ - ♀	177,43
Average	251,18786	Average	256,89	Average	257,23
SD	47,401084	SD	48,183317	SD	60,83

Στον πίνακα 5 που ακολουθεί, αναφέρονται τα βάρη σώματος όλων των πειραματόζων της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), καθώς επίσης και τα βάρη των εσωτερικών οργάνων τους, μετά τη διενέργεια νεκροτομής.

Τα νεκροτομικά παρασκευάσματα τα οποία λήφθηκαν από κάθε πειραματόζωο, το οποίο συμμετείχε στο συγκεκριμένο πείραμα χρόνιας τοξικότητας του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* και *Abies alba*, αναφέρονται στα εξής: Εγκέφαλος – Θυρεοειδής αδένας και λεμφαδένες – Καρδιά – Πνεύμονες και τραχεία – Μυς πρόσθιου άκρου - Σπλήνας – Ήπαρ – Αριστερός νεφρός και επινεφρίδιο – Δεξιός νεφρός και επινεφρίδιο – Στόμαχος – Πάγκρεας – Αριστερός και Δεξιός όρχις – Μήτρα και παράπλευρα εξαρτήματα.

Πίνακας 5: Βάρη πειραματόζων Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) και βάρη των εσωτερικών οργάνων τους μετά την διενέργεια νεκροτομής, στο πείραμα χρόνιας τοξικότητας του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *V. album* και *A. alba*.

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ + ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ	ΚΑΡΔΙΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ + ΤΡΑΧΕΙΑ	ΜΥΣ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΑΚΡΟΥ	ΣΠΛΗΝΑΣ
	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g
K ₄ Z ₁ - ♂	263,44	1,63	2,01	0,93	2,31	0,67	0,53
K ₄ Z ₂ - ♂	319,80	1,93	2,08	1,03	2,11	0,47	0,52
K ₄ Z ₃ - ♂	379,90	1,96	2,31	1,05	2,41	0,61	0,62
K ₅ Z ₁ - ♂	340,20	1,83	3,28	1,02	2,25	0,57	0,56
K ₅ Z ₂ - ♂	348,60	1,90	2,31	1,03	2,28	-----	0,49
K ₆ Z ₁ - ♂	283,85	1,57	2,33	0,90	2,01	-----	0,37
K ₆ Z ₂ - ♂	329,00	1,85	2,46	1,09	2,21	-----	0,56
K ₁₀ Z ₁ - ♀	237,61	1,90	1,54	0,73	1,92	-----	0,56
K ₁₀ Z ₂ - ♀	207,84	1,80	1,64	0,78	1,60	-----	0,50
K ₁₀ Z ₃ - ♀	242,67	1,97	2,04	0,87	1,81	-----	0,36
K ₁₁ Z ₁ - ♀	228,31	1,91	1,36	0,90	1,89	-----	0,46
K ₁₁ Z ₂ - ♀	230,62	1,78	1,61	0,71	1,96	0,24	0,46
K ₁₂ Z ₁ - ♀	230,98	1,81	1,13	0,85	2,04	1,02	0,47
K ₁₂ Z ₂ - ♀	191,20	1,80	1,60	1,14	1,05	0,82	0,38
Average	273,85857	1,8314285	1,9785714	0,9307	1,9892857	0,6285714	0,4885714
SD	59,389337	0,1161469	0,5527950	0,1344	0,3486339	0,2488258	0,0783343
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	ΗΠΑΡ	ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΝΕΦΡΟΣ + ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟ	ΔΕΞΙΟΣ. ΝΕΦΡΟΣ + ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟ	ΣΤΟΜΑΧΟΣ	ΠΑΓΚΡΕΑΣ	ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ + ΔΕΞΙΟΣ ΟΡΧΙΣ	ΜΗΤΡΑ & ΕΞΑΡΤΗ ΜΑΤΑ
	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g
K ₄ Z ₁ - ♂	8,58	1,29	1,15	2,76	2,76	5,40	-----
K ₄ Z ₂ - ♂	8,90	1,04	1,10	1,54	1,57	6,39	-----
K ₄ Z ₃ - ♂	11,70	1,33	1,54	2,06	1,57	7,77	-----
K ₅ Z ₁ - ♂	11,30	1,04	1,37	2,05	2,21	7,95	-----
K ₅ Z ₂ - ♂	10,74	1,31	1,44	-----	1,65	7,71	-----
K ₆ Z ₁ - ♂	8,81	0,94	1,06	-----	1,41	8,17	-----
K ₆ Z ₂ - ♂	11,58	1,16	1,11	-----	1,24	8,53	-----
K ₁₀ Z ₁ - ♀	7,90	0,86	0,93	-----	1,36	-----	1,31
K ₁₀ Z ₂ - ♀	7,37	0,76	0,75	-----	1,14	-----	0,80
K ₁₀ Z ₃ - ♀	8,76	0,98	1,07	-----	1,54	-----	1,24
K ₁₁ Z ₁ - ♀	8,62	0,88	1,00	-----	1,96	-----	1,35
K ₁₁ Z ₂ - ♀	8,60	0,92	0,97	-----	1,55	-----	1,44
K ₁₂ Z ₁ - ♀	9,05	1,00	0,92	1,72	1,10	-----	1,18
K ₁₂ Z ₂ - ♀	7,50	0,80	0,87	1,27	0,83	-----	1,64
Average	9,2435714	1,02214285	1,09142857	1,9	1,56357142	7,42	1,28
SD	1,4711932	0,18667860	0,22356747	0,5189604	0,48965619	1,11	0,25916532

Πίνακας 6: Βάρη πειραματόζων Ομάδας Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.) και βάρη των εσωτερικών οργάνων τους στα οποία χορηγήθηκε το μικτό φυτικό εκχύλισμα ενδοπεριτοναϊκώς επί 65 ημέρες.

ΟΜΑΔΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ + ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ	ΚΑΡΔΙΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ + ΤΡΑΧΕΙΑ	ΜΥΣ ΠΡΟΣΘΙΟΥ ΑΚΡΟΥ	ΣΠΛΗΝΑΣ
	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g
K ₁ Z ₁ - ♂	176,00	1,69	2,10	0,62	2,30	-----	0,27
K ₁ Z ₂ - ♂	292,11	1,80	1,77	1,07	1,58	-----	0,35
K ₁ Z ₃ - ♂	285,17	1,75	2,29	0,99	2,18	-----	0,53
K ₂ Z ₁ - ♂	345,50	1,94	2,18	1,03	2,83	-----	0,63
K ₂ Z ₂ - ♂	356,50	2,08	1,78	1,15	2,28	-----	0,59
K ₃ Z ₁ - ♂	322,80	1,84	1,47	0,87	2,09	-----	1,02
K ₃ Z ₂ - ♂	309,70	1,75	2,23	0,94	2,05	-----	0,59
K ₇ Z ₁ - ♀	227,84	1,90	1,48	0,89	1,32	-----	0,87
K ₇ Z ₂ - ♀	221,15	1,81	1,01	1,05	2,29	-----	0,57
K ₇ Z ₃ - ♀	236,80	1,88	1,51	1,06	1,72	-----	0,65
K ₈ Z ₁ - ♀	192,45	1,69	1,54	0,70	1,72	-----	0,74
K ₈ Z ₂ - ♀	223,70	1,84	1,60	0,72	2,06	-----	0,91
K ₉ Z ₁ - ♀	234,07	1,92	2,13	0,79	1,97	-----	0,55
K ₉ Z ₂ - ♀	177,43	-----	2,16	0,70	1,60	-----	0,25
Average	257,23	1,8376923	1,8	0,898571	2,00	-----	0,6085714
SD	60,83	0,1090988	0,3849197	0,168698	0,38675104	-----	0,2269821
ΟΜΑΔΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	ΗΠΑΡ	ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΝΕΦΡΟΣ + ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟ	ΔΕΞΙΟΣ. ΝΕΦΡΟΣ + ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΟ	ΣΤΟΜΑΧΟΣ	ΠΑΓΚΡΕΑΣ	ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ + ΔΕΞΙΟΣ ΟΡΧΙΣ	ΜΗΤΡΑ & ΕΞΑΡΤΗ ΜΑΤΑ
	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g	βάρος g
K ₁ Z ₁ - ♂	4,54	0,65	0,77	-----	1,28	3,50	-----
K ₁ Z ₂ - ♂	8,74	0,84	0,90	-----	1,58	7,39	-----
K ₁ Z ₃ - ♂	10,94	1,12	1,40	-----	1,70	7,61	-----
K ₂ Z ₁ - ♂	12,42	1,15	1,19	-----	2,91	8,87	-----
K ₂ Z ₂ - ♂	13,31	1,20	1,36	-----	2,16	9,21	-----
K ₃ Z ₁ - ♂	11,15	1,03	1,05	-----	2,39	7,88	-----
K ₃ Z ₂ - ♂	12,17	1,00	1,15	-----	2,59	8,87	-----
K ₇ Z ₁ - ♀	10,21	0,86	0,99	-----	1,68	-----	1,34
K ₇ Z ₂ - ♀	8,87	1,13	1,20	-----	1,38	-----	1,88
K ₇ Z ₃ - ♀	10,89	0,87	0,95	-----	2,23	-----	2,15
K ₈ Z ₁ - ♀	8,41	0,83	0,86	-----	1,89	-----	1,29
K ₈ Z ₂ - ♀	10,90	0,96	0,92	-----	1,98	-----	2,37
K ₉ Z ₁ - ♀	9,22	0,92	1,07	-----	2,44	-----	1,46
K ₉ Z ₂ - ♀	8,04	0,81	0,90	-----	1,32	-----	1,03
Average	9,9864286	0,955	1,05	-----	1,96642857	7,62	1,6457142
SD	2,2365035	0,15785826	0,19	-----	0,50620164	1,9471383	0,4945320

Πίνακας 7: Εκατοστιαίες μεταβολές των βαρών των σωμάτων και των οργάνων των ζώων στις ομάδες ελέγχου (Ο.Ε.) και χρόνιας τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.), κατόπιν ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης σε επίμυες Wistar, του μικτού εκχυλίσματος *Viscum album* και *Abies alba*.

Σωματομετρικά στοιχεία Βάρος σε g	Ομάδα Ελέγχου (Ο.Ε.) Μέσος όρος	Ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.) Μέσος όρος	Διαφορά βάρους (Ο.Ε. – Ο.Χ.Τ.)	Ποσοστό διαφοράς (ως προς Ο.Ε.)	Ποσοστό διαφοράς (ως προς Ο.Χ.Τ.)
Βάρος σώματος	273,85857	257,23	16,62	+ 6,07 %	- 6,46 %
Εγκέφαλος	1,831428571	1,837692308	- 0,006263737	- 0,34 %	+ 0,34 %
Θυρεοειδής αδένας	1,978571429	1,8	0,178571429	+ 9,03 %	- 9,92 %
Καρδιά	0,930714	0,89857143	0,03214257	+ 3,45 %	- 3,58 %
Πνεύμονες	1,989285714	2,00	- 0,010714286	- 0,54 %	+ 0,54 %
Σπλήνας	0,488571429	0,60857143	- 0,12	- 24,56 %	+ 19,72 %
Ήπαρ	9,2435714	9,9864286	- 0,742857176	- 8,04 %	+ 7,44 %
Αριστερός νεφρός + επινεφρίδιο	1,022142857	0,955	0,067142857	+ 6,57 %	- 7,03 %
Δεξιός νεφρός + επινεφρίδιο	1,091428571	1,05	0,041428571	+ 3,80 %	- 3,95 %
Πάγκρεας	1,563571429	1,966428571	- 0,4028571	- 25,77 %	+ 20,49 %
Όρχεις	7,42	7,62	- 0,2	- 2,70 %	+ 2,62 %
Μήτρα και εξαρτήματα	1,28	1,645714286	- 0,3657142	- 28,57 %	+ 22,22 %

Γενικά παρατηρείται μια μείωση του σωματικού βάρους των ζώων που έλαβαν το μικτό φυτικό εκχύλισμα. Η μείωση αυτή φαίνεται να μην είναι στατιστικά σημαντική σε αρκετά από τα όργανα των ζώων. Από την άλλη πλευρά βλέπουμε μια αύξηση βάρους στον σπλήνα, στο ήπαρ στο πάγκρεας και στην μήτρα, για την ομάδα των ζώων που έλαβε για 65 ημέρες το εκχύλισμα των δύο φυτών. Οι μεταβολές του βάρους των ζώων, όπως επίσης

και των οργάνων τους, δεν μπορούν με τα παρόντα δεδομένα να ερμηνευτούν από κάποιες συγκεκριμένες βιολογικές δράσεις του εκχυλίσματος του φυτού.

Πίνακας 8: Αιματολογικές εξετάσεις και μέσοι όροι έμμορφων συστατικών του αίματος της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) των επίμυων Wistar, κατά την αιμοληψία, που διενεργήθηκε κατά το πέρας του πειράματος (65 ημέρες).

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
	$10^3 / \mu\text{l}$	$10^6 / \mu\text{l}$	g / dl	%	fl	pg	g / dl
K ₄ Z ₁ - ♂	7,64	8,52	15,4	45,2	53,1	18,1	34,1
K ₄ Z ₂ - ♂	-----	6,99	12,9	39,3	56,2	18,5	32,8
K ₄ Z ₃ - ♂	-----	7,88	14,7	46,1	58,5	18,7	31,9
K ₅ Z ₁ - ♂	-----	8,34	14,9	46,8	56,1	17,9	31,8
K ₆ Z ₁ - ♂	5,51	7,66	14,6	42,0	54,8	19,1	34,8
K ₆ Z ₂ - ♂	6,99	8,31	15,5	45,3	54,5	18,7	34,2
K ₁₀ Z ₁ - ♀	5,41	7,22	14,2	40,8	56,5	19,7	34,8
K ₁₀ Z ₂ - ♀	5,73	7,41	14,4	41,0	55,3	19,4	35,1
K ₁₀ Z ₃ - ♀	3,65	7,10	13,8	40,8	57,5	19,4	33,8
K ₁₁ Z ₁ - ♀	6,26	7,64	15,0	43,1	56,4	19,6	34,8
K ₁₁ Z ₂ - ♀	5,46	7,91	14,9	43,0	54,4	18,8	34,7
K ₁₂ Z ₁ - ♀	-----	6,96	13,4	41,8	60,1	19,3	32,1
Average	5,831	7,667	14,475	42,933	56,116	18,933	33,742
SD	1,194	0,543	0,785	2,411	1,925	0,580	1,251
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	RDW-SD	RDW-CV	PLT	PDW	MPV	P - LCR	
	fl	%	$10^3 / \mu\text{l}$	fl	fl	%	
K ₄ Z ₁ - ♂	29,2	17,1	686	11,4	9,1	18,9	
K ₄ Z ₂ - ♂	31,7	15,7	499	11,0	9,1	19,3	
K ₄ Z ₃ - ♂	34,7	17,3	837	12,4	9,8	24,7	
K ₅ Z ₁ - ♂	33,1	17,8	964	10,4	8,9	16,5	
K ₆ Z ₁ - ♂	25,2	13,3	827	9,9	8,6	14,7	
K ₆ Z ₂ - ♂	24,9	14,2	878	9,8	8,7	15,6	
K ₁₀ Z ₁ - ♀	23,3	12,2	1082	9,2	8,5	12,5	
K ₁₀ Z ₂ - ♀	22,8	12,0	812	10,8	9,2	19,8	
K ₁₀ Z ₃ - ♀	24,4	12,3	888	10,5	8,9	16,6	
K ₁₁ Z ₁ - ♀	23,6	12,3	926	9,8	8,6	14,4	
K ₁₁ Z ₂ - ♀	23,6	14,2	1098	10,0	8,7	15,5	
K ₁₂ Z ₁ - ♀	33,1	15,2	1009	10,7	9,0	17,6	
Average	27,467	14,467	875,5	10,492	8,925	17,175	
SD	4,542	2,137	166,800	0,856	0,357	3,204	

Πίνακας 9: Αιματολογικές εξετάσεις και μέσοι όροι έμμορφων συστατικών του αίματος της Ομάδας Χρόνιας Τοξικότητας (Ο.Χ.Τ.) των επίμυων Wistar, κατά την αιμοληψία, που διενεργήθηκε στη λήξη του πειράματος (65 ημέρες).

ΟΜΑΔΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
	10³ / μl	10⁶ / μl	g / dl	%	fl	pg	g / dl
K₁ Z₂ - ♂	9,17	8,23	14,7	42,2	51,3	17,9	34,8
K₁ Z₃ - ♂	5,89	8,75	15,9	45,9	52,5	18,2	34,6
K₂ Z₁ - ♂	4,72	9,05	16,5	47,4	52,4	18,2	34,8
K₃ Z₁ - ♂	3,66	6,54	12,5	39,3	60,1	19,1	31,8
K₇ Z₁ - ♀	5,49	7,21	13,9	40,3	55,9	19,3	34,5
K₇ Z₃ - ♀	4,83	7,52	14,3	40,5	53,9	19,0	35,3
K₈ Z₁ - ♀	4,74	6,84	13,2	39,6	57,9	19,3	33,3
K₈ Z₂ - ♀	2,65	5,27	11,4	34,5	65,5	21,6	33,0
Average	5,144	7,426	14,05	41,212	56,188	19,075	34,012
SD	1,918	1,246	1,694	4,034	4,812	1,159	1,190
ΟΜΑΔΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ							
ΟΝΟΜΑ ΖΩΟΥ	RDW-SD	RDW-CV	PLT	PDW	MPV	P - LCR	
	fl	%	10³ / μl	fl	fl	%	
K₁ Z₂ - ♂	26,5	16,6	1017	9,2	8,4	12,8	
K₁ Z₃ - ♂	27,1	17,1	1078	9,3	8,3	12,2	
K₂ Z₁ - ♂	24,9	16,3	1043	8,9	8,1	10,6	
K₃ Z₁ - ♂	44,5	21,8	1639	8,9	8,3	11,4	
K₇ Z₁ - ♀	24,4	12,5	1132	9,6	8,7	14,3	
K₇ Z₃ - ♀	24,1	13,2	1039	9,8	8,8	15,4	
K₈ Z₁ - ♀	26,3	13,0	891	9,1	8,3	11,4	
K₈ Z₂ - ♀	46,2	21,3	1024	8,6	8,1	10,5	
Average	30,5	16,475	1107,875	9,175	8,375	12,325	
SD	9,237	3,599	225,150	0,392	0,255	1,757	

Στο πέρας του πειράματος χρόνιας τοξικότητας (μετά τη παρέλευση 65 ημερών), με το μικτό εκχύλισμα των φυτών *Viscum album* και *Abies alba*,

διενεργήθηκαν αιμοληψίες, στο μεγαλύτερο αριθμό ζώων που συμμετείχαν στο συγκεκριμένο πειραματισμό και πιο συγκεκριμένα σε 12 από τα 14 ζώα της Ομάδας Ελέγχου και σε 8 από τα 14 ζώα της Ομάδας Χρόνιας Τοξικότητας.

Τα επί μέρους αποτελέσματα των έμμορφων συστατικών του αίματος, παριστάνονται με ακρίβεια στους παραπάνω πίνακες 7 και 8, στους οποίους δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο αιματολογικών παραμέτρων των διαφορετικών ομάδων ζώων (Ομάδα Ελέγχου και Ομάδα Χρόνιας Τοξικότητας).

Δ(2). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ *In Vivo* ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ ΕΠΩΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΚΑΙ ΕΓΧΥΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Γενικότερα υπάρχουν τα εξής αποτελέσματα από το πείραμα της αναστολής – τροποποίησης της καρκινογόνου δράσης του 3,4 – βενζοπυρενίου από το εκχύλισμα των φυτών *Viscum album* + *Abies alba*:

1^{ον}) Η αλληλεπίδραση του μικτού εκχυλίσματος με το 3,4–βενζοπυρενίο (B[a]P) μειώνει την καρκινογόνα δράση του τελευταίου. Έτσι έχουμε αναστολή της χημικής καρκινογένεσης στο 33 % του συνόλου των πειραματόζων.

2^{ον}) Στην ομάδα των πειραματόζων που έλαβαν το διάλυμα 3,4–βενζοπυρενίου – εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba* παρατηρείται καθυστέρηση της εμφάνισης όγκων εν συγκρίσει προς τα πειραματόζωα της Ομάδας Ελέγχου. Έτσι ο μέσος χρόνος ημερών που μεσολαβούν από την έγχυση του καρκινογόνου μέχρι της εμφάνισης όγκου στην ομάδα των ζώων Ελέγχου είναι $82 \pm 9,04$ ημέρες, ενώ ο αντίστοιχος χρόνος στην ομάδα των ζώων αναστολής της χημικής καρκινογένεσης (ομάδα εξουδετέρωσης) είναι ίσος προς $93,875 \pm 5,14$ ημέρες.

Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η δράση του εκχυλίσματος πρέπει να έλαβε χώρα κατά κύριο λόγο επί της έναρξης και της προώθησης της χημικής καρκινογένεσης.

Πίνακας 10: Πίνακας αποτελεσμάτων *In vivo* πειράματος αναστολής και τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης B[a]P, μέσω επώασης του μικτού φυτικού εκχυλίσματος και έγχυσής του σε επίμυες Wistar.

ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ			
Ζώα Ομάδας Ελέγχου	Βάρος Όγκου (g)	Ανατομική Θέση	Ιστολογικός Τύπος
1	1,40	Δεξιά ωμοπλάτη	—
2	1,92	Δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
3	3,12	Δεξιά ωμοπλάτη	Πολύμορφο ιστοκύττωμα
4	3,47	Αριστερή ωμοπλάτη	Πολύμορφο ιστοκύττωμα
5	11,28	Αυχένας - αριστερά	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
6	2,30	Δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
7	1,00	Δεξιά ωμοπλάτη	Ινοσάρκωμα
8	3,60	κάτω αριστερή + δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
9	7,20	Άνω δεξιά ωμοπλάτη	Μικτός όγκος (ατρακτο-ιστιοκυτταρικός)
10	3,50	Άνω και κάτω δεξιά ωμοπλάτη	Ινοσάρκωμα
11	3,24	κάτω δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
12	1,10	Άνω δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
13	38,90	Όλη η δεξιά ωμοπλάτη	Μικτός όγκος (ατρακτο – ιστοκυτταρικός)
14	34,80	Δεξιά + αριστερή άνω ωμοπλάτη (2 όγκοι)	Ραβδομυοσάρκωμα
15	3,57	κάτω δεξιά ωμοπλάτη	Ινοσάρκωμα
Επιτυχία χημικής καρκινογένεσης : 100 %			

Ζώα Ομάδας Θεραπείας	Βάρος Όγκου (g)	Ανατομική Θέση	Ιστολογικός Τύπος
1	0	Δεν ευρέθη όγκος	—
2	0	Δεν ευρέθη όγκος	—
3	3,22	Αριστερή ωμοπλάτη	Ιστιοκύττωμα
4	1,86	Δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός όγκος
5	6,47	Δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός – Ιστιοκυτταρικός όγκος
6	7,95	Δεξιά ωμοπλάτη	Ατρακτοκυτταρικός
7	2,5	Άνω δεξιά ωμοπλάτη	Ιστιοκυτταρικός όγκος
8	0,94	Δεξιά ωμοπλάτη	Επιθηλιόμορφος όγκος
9	35,9	Δεξιά ωμοπλάτη	Ραβδομυοσάρκωμα
10	0	Δεν ευρέθη όγκος	—
11	0	Δεν ευρέθη όγκος	—
12	0,86	Άνω δεξιά ωμοπλάτη	Ραβδομυοσάρκωμα
13	Θάνατος ζώου		
14	Θάνατος ζώου		
Επιτυχία χημικής καρκινογένεσης: 67 %		Αναστολή Χημικής Καρκινογένεσης: 33 %	

Δ3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΕΠΙ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ WISTAR ΠΟΥ ΑΝΕΠΤΥΞΑΝ ΟΓΚΟΥΣ ΜΕ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΥΓΓΕΝΟΥΣ ΕΠΙΜΥΟΣ.

1^ο) Βάρη των όγκων

Πίνακας 11

ΒΑΡΟΣ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΘΑΝΑΤΟ ΤΩΝ ΖΩΩΝ (g)		
A / A ΖΩΩΝ	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
1	54,53	9,93
2	95,00	12,63
3	96,97	74,18
4	21,13	26,12
5	50,88	18,64
6	63,70	21,25
7	68,12	7,82
8	62,43	8,77
9	82,00	11,03
10	65,20	70,96
11	63,70	50,38
12	93,00	19,72
13	31,00	19,57
14	45,00	42,68
15	54,28	51,12
16	72,50	29,12
17	78,63	12,49
18	49,00	13,62
19	51,00	38,41
20	76,23	28,42
21	65,21	25,37
22	62,94	32,15
23	59,83	27,24
24	67,10	30,71
25	62,77	27,94
26	64,44	26,36
Average	63,715	28,332
SD	17,5923	17,5752

Όπως παρατηρούμε ο λόγος του μέσου βάρους των όγκων της ομάδας ελέγχου προς εκείνο της ομάδας θεραπείας είναι ίσος προς 2,25, γεγονός που δηλώνει ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των κακοηθών όγκων μειώνεται κάτω από το υποδιπλάσιο, μέσω της δράσης της συγκεκριμένης ημερήσιας δόσης του εκχυλίσματος *Viscum album + Abies alba*.

Ο υποδιπλασιασμός της ανάπτυξης των νεοπλασμάτων φαίνεται να είναι η συνιστώσα δύο στοιχείων:

- α) μιας επιβράδυνσης των κυτταρικών κύκλων, καθώς και
- β) μιας αύξησης του ρυθμού θανάτου των νεοπλασματικών κυττάρων.

Τα δύο αυτά στοιχεία, όπως παρατηρούμε και στην κυτταροκαλλιέργεια, συνυπάρχουν και ενδεχομένως να συσχετίζονται μεταξύ τους. Ωστόσο στο επίπεδο του πειραματόζωου φαίνεται να έχουμε μια εντατικοποίηση της δράσης του θεραπευτικού μίγματος, ενδεχομένως από μια αύξηση της αντικαρκινικής δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος των πειραματόζωων εκ μέρους του εκχυλίσματος του *Viscum album + Abies alba*. Συνεπώς η παρατηρούμενη αύξηση του ρυθμού θανάτου των καρκινικών κυττάρων στους όγκους φαίνεται ότι είναι άθροισμα μιας αμιγούς κυτταροστατικής δράσεως, ασκούμενης άμεσα στα σαρκωματικά κύτταρα, η οποία οδηγεί τόσο σε επιβράδυνση των κυτταρικών κύκλων όσο και σε θάνατο, όπως επίσης και μιας έμμεσης αύξησης του ρυθμού θανάτου των σαρκωματικών κυττάρων που οφείλεται σε ανοσολογικές δράσεις, τουλάχιστον σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

Αν και μέσα στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής δεν μελετήσαμε τις βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες δράσεις του εκχυλίσματος στην ανοσολογική απάντηση των επίμυων Wistar, εν τούτοις υπάρχουν έμμεσα στοιχεία, προερχόμενα από σχετικά πειράματα με ανθρώπινα NK λεμφοκύτταρα, τα οποία δείχνουν καθαρά ότι υπάρχει μια σαφής διεγερτική δράση του εκχυλίσματος των δύο φυτών στην κυτταροτοξική ικανότητα των λεμφοκυττάρων NK εναντίον καρκινικών κυττάρων της σειράς K-562, ως στόχων.

2^ον Χρόνοι επιβίωσης

Οι χρόνοι επιβίωσης των πειραματόζωων φαίνονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Συσχέτιση μεταξύ της επιβίωσης και του βάρους των όγκων των δύο ομάδων πειραματόζων.

A / A ΖΩΩΝ	ΒΑΡΗ ΟΓΚΩΝ ΖΩΩΝ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ	Ημέρες επιβίωσης ζώων Ελέγχου	ΒΑΡΗ ΟΓΚΩΝ ΖΩΩΝ ΟΜΑΔΑΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	Ημέρες επιβίωσης ζώων Θεραπείας
1	54,53	20	9,93	42
2	95,00	25	12,63	44
3	96,97	26	74,18	59
4	21,13	14	26,12	48
5	50,88	19	18,64	45
6	63,70	21	21,25	48
7	68,12	20	7,82	54
8	62,43	20	8,77	58
9	82,00	22	11,03	60
10	65,20	18	70,96	60
11	63,70	18	50,38	55
12	93,00	23	19,72	57
13	31,00	15	19,57	48
14	45,00	14	42,68	49
15	54,28	18	51,12	52
16	72,50	21	29,12	41
17	78,63	18	12,49	40
18	49,00	12	13,62	44
19	51,00	21	38,41	42
20	76,23	21	28,42	47
21	65,21	20	25,37	39
22	62,94	21	32,15	60
23	59,83	21	27,24	60
24	67,10	23	30,71	38
25	62,77	22	27,94	55
26	64,44	22	26,36	53
Average	63,715	19,808	28,332	49,923
SD	17,5923	3,31	17,5752	7,39

Στον παραπάνω πίνακα 12 παρατηρούμε ότι λαμβάνει χώρα ένας υπερδιπλασιασμός της επιβίωσης των πειραματόζων και ταυτοχρόνως υποδιπλασιασμός του βάρους των όγκων τους ως συνόλου.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που αφορά την επιθετικότητα της δράσης του εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba* είναι η εξής:

Αν το εκχύλισμα ενεθεί σε μεγάλες δόσεις, ικανές να επιφέρουν νέκρωση σε μεγάλη ποσότητα νεοπλασματικού ιστού, τότε η μαζική νέκρωση των κακοηθών κυττάρων μπορεί να συνοδευτεί από ένα οξύτατο σύνδρομο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης, αιμορραγίας και εν τέλει θανάτου του πειραματόζωου από ένα είδος κατάρριψης της κυκλοφορίας που εμφανίζει ομοιότητες με την αιμορραγική και αναφυλακτική καταπληξία.

Το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται εντονότερα στα ζώα που αναπτύσσουν ευμεγέθεις όγκους και τότε η νέκρωση του νεοπλάσματος το πυροδοτεί ανεξαιρέτως σε όλες τις περιπτώσεις. Το σύνδρομο αυτό δεν έχει να κάνει με την ποσότητα του χρησιμοποιούμενου εκχυλίσματος, διότι, όπως είδαμε στο πείραμα της τοξικότητας, οι ίδιες δόσεις εκχυλίσματος χορηγούμενες σε υγιή πειραματόζωα, επί 20 ημέρες, δεν προκάλεσαν κανέναν θάνατο στην ομάδα χορήγησης εκχυλίσματος. Επίσης οι διπλάσιες δόσεις δεν επέφεραν κανέναν θάνατο στην ομάδα χορήγησης εκχυλίσματος, αν και δινόταν κάθε μέρα ενδοπεριτοναϊκά, επί 45 ημέρες.

Το φαινόμενο των αυθόρμητων θανάτων εμφανίστηκε μόνον στα καρκινοπαθή πειραματόζωα που έφεραν μεγάλους όγκους και οι οποίοι μια ή δύο ημέρες μετά την έναρξη της θεραπείας έδειξαν φαινόμενα μαζικής νέκρωσης, αιμορραγικής ρευστοποίησης μιας μεγάλης κεντρικής τους περιοχής και εν τέλει πλήρη αποσάθρωση του όγκου, γενικευμένη αιμορραγία και θάνατο του ζώου. Η παρακέντηση και αφαίρεση του τετηγμένου κέντρου του όγκου προστάτευσε το πειραματόζωο από τον θάνατο, αν και όχι σε όλες τις περιπτώσεις.

Συνεπώς, η παρακολούθηση των αιματολογικών παραμέτρων και των παραμέτρων της πήξης, είναι πολύ σημαντική για την εμβάθυνση της μελέτης των δράσεων του εν λόγω cocktail σε καρκινοπαθή πειραματόζωα μικρών σωματικών διαστάσεων, όπως ο επίμυς Wistar.

Δ(4): ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ *In Vivo* ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΣΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΩΣ 2×10^6 ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ – ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba*.

Τα δεδομένα που εξάγονται από την ανάλυση του εν λόγω πειράματος δείχνουν μια ουσιαστική μείωση του αριθμού των μεταστάσεων των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, τα οποία ενέθησαν σε δύο διαφορετικούς χρόνους και σε διαφορετικούς αριθμούς ενδοφλεβίως στα πειραματόζωα, μέσω των έξω σφαγίτιδων φλεβών.

Τα δεδομένα που αφορούν την εντοπισθείσα μεταστατικότητα στα βασικά σπλάχνα παρουσιάζονται στους πίνακες 13 και 14.

Πίνακας 13: Αριθμός μεταστάσεων που εντοπίστηκε στα διάφορα σπλάχνα των επίμυων της ομάδας ελέγχου του πειράματος της μεταστατικής αιματογενούς διασποράς.

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ					
ΖΩΟ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΟΡΓΑΝΟ - ΣΥΣΤΗΜΑ			
K ₁ Z ₁ - ♀	ΔΥΟ (2)	ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ (1)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ (1)	_____	_____
K ₁ Z ₂ - ♀	ΔΥΟ (2)	ΔΕΞΙΟΣ ΜΑΣΧΑΛΙΑΙΟΣ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑΣ (1)	ΔΕΞΙΟΣ ΒΡΑΧΙΟΝΑΣ (ΔΕΡΜΑ - 1)	_____	_____
K ₁ Z ₃ - ♀	ΤΕΣΣΕΡΙΣ (4)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ (1)	ΣΠΛΗΝΑΣ (1)	ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ (1)	ΠΕΡΙΚΑΡΔΙΟ (1)
K ₄ Z ₁ - ♂	>ΔΕΚΑ (>10)	ΗΠΑΡ (5 ΕΣΤΙΕΣ)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ (>5)	_____	_____
K ₄ Z ₂ - ♂	ΕΠΤΑ (7)	ΗΠΑΡ (6 ΕΣΤΙΕΣ)	ΜΕΙΖΩΝ ΘΩΡΑΚΙΚΟΣ (1)	_____	_____
K ₄ Z ₃ - ♂	> ΕΞΙ (>6)	ΗΠΑΡ (ΕΥΜΕΓΕΘΗΣ ΟΓΚΟΣ)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ (ΟΙΔΗΜΑΤΩΔΕΙΣ – ΔΙΑΣΠΑΡΤΑ ΟΖΙΔΙΑ > 5)	_____	_____
K ₅ Z ₁ - ♂	> ΕΠΤΑ (>7)	ΗΠΑΡ (2 ΕΥΜΕΓΕΘΕΙΣ ΟΓΚΟΙ)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΟΙΔΗΜΑΤΩΔΕΙΣ (ΠΟΛΛΑ ΟΖΙΔΙΑ >5)	_____	_____
K ₅ Z ₂ - ♂	ΔΕΚΑ ΕΞΙ (16)	ΗΠΑΡ ΔΙΟΓΚΩΜΕΝΟ (15)	ΕΝΤΕΡΟ (1)	_____	_____
K ₅ Z ₃ - ♂	ΗΠΑΡ (5 ΟΓΚΟΙ)	_____	_____	_____	_____
ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΑΣΤΑ ΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ	ΗΠΑΡ 27 ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ >> 16 ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ 1	ΑΛΛΕΣ ΕΝΤΟΠΙΣΕΙΣ 15	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ > 59

Πίνακας 14: Αριθμός μεταστάσεων στα σπλάχνα των επίμυων της ομάδας θεραπείας.

ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ					
ΖΩΟ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΟΡΓΑΝΟ - ΣΥΣΤΗΜΑ			
K ₂ Z ₁ - ♀	ΜΗΔΕΝ (0)	ΗΠΑΡ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ - ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₂ Z ₂ - ♀	ΜΗΔΕΝ (0)	ΗΠΑΡ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₂ Z ₃ - ♀	ΜΙΑ ΕΣΤΙΑ ΣΤΟΝ ΥΠΕΡΚΛΕΙΔΙΟ ΒΟΘΡΟ (ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΓΧΥΣΗΣ)	ΗΠΑΡ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₃ Z ₂ - ♀	ΜΗΔΕΝ (0)	ΗΠΑΡ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₆ Z ₁ - ♂	ΔΥΟ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΗΠΑΡ (2)	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₆ Z ₂ - ♂	ΔΥΟ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΗΠΑΡ (2)	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₆ Z ₃ - ♂	ΤΡΕΙΣ ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΗΠΑΡ (3)	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₇ Z ₁ - ♂	ΜΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΚΑΡΔΙΟ	ΗΠΑΡ ΚΑΘΑΡΟ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₇ Z ₂ - ♂	ΤΡΕΙΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΗΠΑΡ (1)	ΔΕΞΙΟΣ ΥΠΕΡΚΛΕΙΔΙΟΣ ΒΟΘΡΟΣ (1) - ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΑΓΚΡΕΑΣ (1) – ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
K ₇ Z ₃ - ♂	ΜΙΑ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟ ΠΑΓΚΡΕΑΣ	ΗΠΑΡ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ – ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ	ΠΑΓΚΡΕΑΣ (1) – ΛΟΙΠΑ ΣΠΛΑΧΝΑ – ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΤΑ ΦΥΣΗ
ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ	ΗΠΑΡ ΟΧΤΩ (8) ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ (ΕΚΤΟΣ ΗΠΑΤΟΣ + ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ) – ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΜΗΔΕΝ (0)	ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ – ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΜΗΔΕΝ (0)	ΑΛΛΕΣ ΕΝΤΟΠΙΣΕΙΣ ΠΕΝΤΕ (5)	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ ΔΕΚΑΤΡΕΙΣ (13)

Τα κύρια όργανα που προσβάλλονται είναι το ήπαρ και οι πνεύμονες, ενώ στα υπόλοιπα σπλάχνα οι μεταστατικές εντοπίσεις είναι σαφώς λιγότερες. Το αξιόλογο δεδομένο που προκύπτει από το εν λόγω πείραμα είναι ότι ο αριθμός των μεταστάσεων που εντοπίζονται γενικά στα ζώα της ομάδας ελέγχου είναι περισσότερες των 59, ενώ στα ζώα θεραπείας είναι 13.

Γενικότερα οι πνευμονικές εντοπίσεις είναι πολυάριθμες και αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι πνεύμονες αποτελούν το πρώτο βιολογικό «φίλτρο» που συναντούν τα καρκινικά κύτταρα αμέσως μετά την έγχυσή τους στην έξω σφαγίτιδα φλέβα. Καθώς εν συνεχεία τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην συστηματική κυκλοφορία, μέσω της αορτής μπορούν να περιπλανηθούν σε όλο το σώμα και να αγκυροβολήσουν δυνητικά σε όλα τα όργανα. Φαίνεται ότι το ήπαρ, εξ αιτίας της δομής και του μεγέθους αυτού, αποτελεί έναν δεύτερο στόχο κατακράτησης των νεοπλασματικών κυττάρων.

Δ(5). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ – ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.

Η χορήγηση υδατικών εκχυλισμάτων στο πόσιμο διάλυμα των επίμυων Wistar οι οποίοι υπέστησαν χημική καρκινογένεση με την χρήση 3,4–βενζοπυρενίου (B[a]P) (όπως αναλυτικώς περιγράψαμε στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων) περιόρισε σημαντικά την εμφάνιση κακοηθών όγκων στην ομάδα των πειραματόζων που λάμβαναν το εν λόγω υδατικό εκχύλισμα, από την ημέρα της χημικής καρκινογένεσης, έως την ημερομηνία του θανάτου αυτών.

Από την άλλη πλευρά τα πειραματόζωα της ομάδας Ελέγχου, στα οποία ομοίως χορηγήθηκε η ίδια ποσότητα 3,4–βενζοπυρενίου ανά ζώο, όπως και στην ομάδα Θεραπείας, η χημική καρκινογένεση ανήλθε στο 100 %, δηλαδή όλα τα ζώα νόσησαν από καρκίνο και κατέληξαν σε μέσο χρονικό διάστημα σαφώς μικρότερο από το αντίστοιχο των ζώων της ομάδας Θεραπείας.

Δηλαδή, στην περίπτωση της Ομάδας Θεραπείας παρατηρήθηκαν δύο φαινόμενα:

1^{ον}) μείωση της επίπτωσης των όγκων και

2^{ον}) αύξηση των προσδόκιμων επιβίωσης των ζώων που εμφάνισαν κακοήγη όγκο, πράγμα που ενδεχομένως οφείλεται στο μικρότερο ποσοστό ανάπτυξης των όγκων.

Αναλυτικότερα τα δεδομένα έχουν ως εξής:

1^{ον}) Μια εβδομάδα μετά την χορήγηση του 3,4 – βενζοπυρενίου έλαβαν χώρα μερικοί θάνατοι πειραματόζων τόσο στην Ομάδα Ελέγχου (δύο θάνατοι), όσο και στην Ομάδα Θεραπείας (δύο θάνατοι). Στην ουσία και οι δύο ομάδες απέμειναν με 18 ζώα, οπότε ήσαν ισότιμες και αποφασίσαμε να μην αναπληρώσουμε τα ζώα που κατέληξαν.

2^{ον}) Όλα τα ζώα της ομάδας Ελέγχου ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους στο σημείο του σώματος όπου είχε πραγματοποιηθεί η έγχυση του B[a]P. Οι όγκοι έγιναν αντιληπτοί δια ψηλαφήσεως σε χρονικό διάστημα περιεχόμενο μεταξύ 80^{ης} και 110^{ης} ημέρας από την χορήγηση του καρκινογόνου. Οι αναπτυχθέντες όγκοι χαρακτηρίστηκαν διαγνωστικά ως λειομυοσαρκώματα.

3^{ον}) Από τα ζώα της Ομάδας Θεραπείας τα 15 ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους, πάντοτε εντοπισμένους στο σημείο έγχυσης του B[a]P. Οι όγκοι αυτοί έγιναν αντιληπτοί δια ψηλαφήσεως μεταξύ 92^{ης} και 125^{ης} ημέρας από την χορήγηση του καρκινογόνου. Αν και η ψηλάφηση μας δίνει την πληροφορία ότι τα καρκινικά κύτταρα αυξήθηκαν σε σημείο ώστε ο όγκος που συνθέτουν να λάβει μακροσκοπικές διαστάσεις, εν τούτοις δεν αποτελεί ασφαλές κριτήριο ότι δεν υπήρχε στο σημείο εκείνο κάποιος πληθυσμός κακοηθών κυττάρων, του οποίου απλώς είχαμε υστέρηση της ανάπτυξης λόγω της δράσης του εκχυλίσματος. Συνεπώς οι σχετικές χρονικές διαφορές στην μακροσκοπική εκδήλωση των κακοηθών όγκων θα έπρεπε να θεωρούνται συμβατικές και να δηλώνουν επιμήκυνση της αναστολής (initiation), της προαγωγής (promotion) και ενδεχομένως της προόδου (progression) της νεοπλασματικής ανάπτυξης.

Για λόγους μιας ακριβέστερης συμβατικής επιμέτρησης του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων, ονομάσαμε Μέσο Χρόνο Ανάπτυξης Όγκων (ΜΕ.Χ.Α.Ο.), το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εμφάνιση ενός όγκου σε μακροσκοπικό επίπεδο (>1 mm), μέχρι τον θάνατο του πειραματόζωου από τις συνέπειες της νεοπλασματικής νόσου.

Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιούμε η νεοπλασματική νόσος αντιπροσωπεύεται ουσιαστικά από έναν μονήρη όγκο που αναπτύσσεται στο σημείο της έγχυσης του καρκινογόνου και από μεταστάσεις που φαίνονται να είναι πολυπληθέστερες στους πνεύμονες και στο ήπαρ, εν συγκρίσει με τα άλλα εσωτερικά όργανα. Ωστόσο ο θάνατος των ζώων φαίνεται να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αυξανόμενη επιβάρυνση που προκαλεί στον οργανισμό η ανάπτυξη αυτού του κυρίου, μονήρους όγκου.

Για να αντιληφθούμε το μέτρο αυτής της επιβάρυνσης φτάνει να αναφέρουμε ότι την στιγμή του θανάτου των ζώων, οι όγκοι τους αντιπροσωπεύουν το 40 – 46 % της συνολικής σωματικής τους μάζας και συνεπώς αποτελούν τεράστια μεταβολικά παράσιτα που καταναλίσκουν ουσιαστικά πάνω από το 50 % των υλικών του οργανισμού (καθόσον είναι ταχέως και διαρκώς αναπτυσσόμενοι).

Οι όγκοι που εμφανίστηκαν στα 15 ζώα της Ομάδας Θεραπείας αναπτύχθηκαν εκθετικά, μέχρις ότου να τα οδηγήσουν στο θάνατο. Ένα εκθετικό αναπτυξιακό πρότυπο ίσχυσε και στην περίπτωση των όγκων της Ομάδας Ελέγχου, αλλά σημειώνοντας καθυστέρηση, σε σχέση προς αυτήν.

Ο Μέσος Χρόνος Ανάπτυξης Όγκων στην Ομάδα Ελέγχου ήταν $69 \pm 6,7$ ημέρες, ενώ ο Μέσος Χρόνος Ανάπτυξης Όγκων στην Ομάδα Θεραπείας ήταν $92,8 \pm 24$ ημέρες.

Και στην περίπτωση των όγκων των ζώων της Ομάδας Θεραπείας η ιστολογική διάγνωση έδειξε ότι επρόκειτο περί λειομυοσαρκωματικών όγκων.

4^{ον}) Τρία από τα ζώα της Ομάδας Θεραπείας δεν εμφάνισαν καθόλου κακοήθεις όγκους.

Τα δεδομένα αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Αναλυτική παρουσίαση των επιβιώσεων των ζώων της Ομάδας Ελέγχου και της Ομάδας Θεραπείας του πειράματος Δ(5) που προέβλεπε την χορήγηση ενός υδατικού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* + *Abies alba* σε επίμυες Wistar στους οποίους είχε χορηγηθεί B[a]P.

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ – Αριθμός Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το B[a]P	ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ – Αριθμός Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το B[a]P	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
K ₁ Z ₁	144	K ₇ Z ₁	135	
K ₁ Z ₂	147	K ₇ Z ₂	179	
K ₁ Z ₃	150	K ₇ Z ₃	215	
K ₂ Z ₁	151	K ₈ Z ₁	222	
K ₂ Z ₂	155	K ₈ Z ₂	239	
K ₂ Z ₃	155	K ₈ Z ₃	239	
K ₃ Z ₁	160	K ₉ Z ₁	240	
K ₃ Z ₂	169	K ₉ Z ₂	240	
K ₃ Z ₃	174	K ₉ Z ₃	241	
K ₄ Z ₁	179	K ₁₀ Z ₁	244	
K ₄ Z ₂	186	K ₁₀ Z ₂	248	
K ₄ Z ₃	195	K ₁₀ Z ₃	269	
K ₅ Z ₁	198	K ₁₁ Z ₁	275	
K ₅ Z ₂	212	K ₁₁ Z ₂	300	
K ₅ Z ₃	227	K ₁₁ Z ₃	320	
K ₆ Z ₁	280	K ₁₂ Z ₁	> 365 (α)	(α) Η επιβίωση αυτή δεν συνηπολογίστηκε στον Μέσο Όρο
K ₆ Z ₂	181	K ₁₂ Z ₂	> 365 (β)	(β) Η επιβίωση αυτή δεν συνηπολογίστηκε στον Μέσο Όρο
K ₆ Z ₃	182	K ₁₂ Z ₃	> 365 (γ)	(γ) Η επιβίωση αυτή δεν συνηπολογίστηκε στον Μέσο Όρο
Average ± SD	180 ± 34		240 ± 45	

5^{ον}) Η αναστολή της καρκινογόνου δράσης του B[a]P δίνεται από τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο: $CP\ B[a]P = (\% \text{ επαγωγή όγκων} / \text{μέσος όρος επιβίωσης των ζώων}) \times 100$. Η εφαρμογή του τύπου στην ομάδα ελέγχου δίνει για το B[a]P την εξής καρκινογόνο ισχύ:

$$CP\ B[a]P = (100 / 180) \times 100 = 56\ (I).$$

Επίσης η εφαρμογή του ίδιου τύπου στο συνολικό διάλυμα 3,4 – βενζοπυρενίου και εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba* μας δίνει την καρκινογόνο δράση του συνολικού διαλύματος:

$$CP\ B[a]P + (V.a.+A.a.) = (75 / 240) \times 100 = 31,25\ (II),$$

η οποία είναι μικρότερη από εκείνη του B[a]P. Συνολικά η μείωση της καρκινογόνου ισχύος του B[a]P που επιτυγχάνεται μέσω της σταθερής χορήγησης του μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών στο πόσιμο ύδωρ δίνεται από την διαφορά των τιμών των εξισώσεων I – II:

$$CP\ B[a]P - CP\ B[a]P + (V.a.+ A.a.) = 56 - 31,25 = 24,75 .$$

Αν εκφραστούμε σε ποσοστά η μείωση της καρκινογόνου ισχύος του B[a]P από το εκχύλισμα είναι ίση προς 55,8 %, δηλαδή προσεγγίζει τον υποδιπλασιασμό της. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στην παρούσα μελέτη δεν συνυπολογίστηκαν οι μακροχρόνιες επιβιώσεις των ζώων που δεν παρουσίασαν όγκους.

6^{ον}) Ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων στην Ομάδα Θεραπείας είναι σαφώς μικρότερος από τον αντίστοιχο της Ομάδας Ελέγχου, όπως ήδη προαναφέραμε.

Τα δεδομένα αυτά φαίνονται στους πίνακες 16α και 16β που ακολουθούν.

Πιο συγκεκριμένα στον πίνακα 16α αποτυπώνεται μια αναλυτική παρουσίαση των σχέσεων ημερών επιβίωσης μετά την έγχυση του B[a]P – ημερομηνίας διάγνωσης του μακροσκοπικού όγκου ($R > 1\text{mm}$) – χρόνου ανάπτυξης εκάστου όγκου, στην Ομάδα Ελέγχου και στην Ομάδα Θεραπείας. Γενικά παρατηρούμε μια αύξηση των μέσων όρων επιβίωσης των ζώων της Ομάδας Θεραπείας, όπως επίσης και του Μέσου Χρόνου Ανάπτυξης των Όγκων αυτών, σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου, όπου οι εν λόγω δύο δείκτες είναι συμπιεσμένοι.

Πίνακας 16α

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ				ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ			
Όνομα Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το Β[α]Ρ	Μακροσκοπική διάγνωση του όγκου μετά το Β[α]Ρ	Χρόνος ανάπτυξης των όγκων από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο	Όνομα Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το Β[α]Ρ	Μακροσκοπική διάγνωση του όγκου μετά το Β[α]Ρ	Χρόνος ανάπτυξης των όγκων από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο
K ₁ Z ₁	144	72	72	K ₇ Z ₁	135	93	42
K ₁ Z ₂	147	73	74	K ₇ Z ₂	179	85	94
K ₁ Z ₃	150	73	77	K ₇ Z ₃	215	107	108
K ₂ Z ₁	151	72	79	K ₈ Z ₁	222	112	110
K ₂ Z ₂	155	80	75	K ₈ Z ₂	239	114	125
K ₂ Z ₃	155	79	76	K ₈ Z ₃	239	104	135
K ₃ Z ₁	160	92	68	K ₉ Z ₁	240	142	98
K ₃ Z ₂	169	102	67	K ₉ Z ₂	240	161	79
K ₃ Z ₃	174	109	65	K ₉ Z ₃	241	146	95
K ₄ Z ₁	179	110	69	K ₁₀ Z ₁	244	132	112
K ₄ Z ₂	186	116	70	K ₁₀ Z ₂	248	170	78
K ₄ Z ₃	195	123	72	K ₁₀ Z ₃	269	174	95
K ₅ Z ₁	198	126	72	K ₁₁ Z ₁	275	188	87
K ₅ Z ₂	212	148	64	K ₁₁ Z ₂	300	231	69
K ₅ Z ₃	227	169	58	K ₁₁ Z ₃	320	255	65
K ₆ Z ₁	280	228	52	K ₁₂ Z ₁			
K ₆ Z ₂	181	113	68	K ₁₂ Z ₂			
K ₆ Z ₃	182	117	65	K ₁₂ Z ₃			
Average ± SD	180,2 ± 34	111,2 ± 40	69 ± 6,7	Average ± SD	240,4 ± 45	147,6 ± 50	92,8 ± 24

Πίνακας 16β

ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ					ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ				
Όνομα Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το Β[a]P	Μακροσκοπική διάγνωση του όγκου μετά το Β[a]P	Χρόνος ανάπτυξης των όγκων από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο	Βάρος όγκου	Όνομα Ζώου	Ημέρες Επιβίωσης μετά το Β[a]P	Μακροσκοπική διάγνωση του όγκου μετά το Β[a]P	Χρόνος ανάπτυξης των όγκων από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο	Βάρος όγκου
K ₁ Z ₁	144	72	72	89	K ₇ Z ₁	135	93	42	76
K ₁ Z ₂	147	73	74	93	K ₇ Z ₂	179	85	94	73
K ₁ Z ₃	150	73	77	81	K ₇ Z ₃	215	107	108	92
K ₂ Z ₁	151	72	79	90	K ₈ Z ₁	222	112	110	89
K ₂ Z ₂	155	80	75	91	K ₈ Z ₂	239	114	125	82
K ₂ Z ₃	155	79	76	102	K ₈ Z ₃	239	104	135	78
K ₃ Z ₁	160	92	68	193	K ₉ Z ₁	240	142	98	81
K ₃ Z ₂	169	102	67	106	K ₉ Z ₂	240	161	79	46
K ₃ Z ₃	174	109	65	110	K ₉ Z ₃	241	146	95	42
K ₄ Z ₁	179	110	69	117	K ₁₀ Z ₁	244	132	112	38
K ₄ Z ₂	186	116	70	117	K ₁₀ Z ₂	248	170	78	45
K ₄ Z ₃	195	123	72	132	K ₁₀ Z ₃	269	174	95	61
K ₅ Z ₁	198	126	72	117	K ₁₁ Z ₁	275	188	87	35
K ₅ Z ₂	212	148	64	148	K ₁₁ Z ₂	300	231	69	27
K ₅ Z ₃	227	169	58	68	K ₁₁ Z ₃	320	255	65	32
K ₆ Z ₁	280	228	52	59	K ₁₂ Z ₁				
K ₆ Z ₂	181	113	68	77	K ₁₂ Z ₂				
K ₆ Z ₃	182	117	65	64	K ₁₂ Z ₃				
Average ± SD	180,2 ± 34	111,2 ± 40	69 ± 6,7	103 ± 33	Average ± SD	240,4 ± 45	147,6 ± 50	92,8 ± 24	60 ± 23

Στον πίνακα 16β διακρίνουμε τις σχέσεις μεταξύ των χρόνων ανάπτυξης των όγκων, της ημερομηνίας διάγνωσης μακροσκοπικού όγκου ($R > 1\text{mm}$), του βάρους των όγκων και του συνολικού προσδόκιμου επιβίωσης των ζώων μετά την έγχυση του B[a]P.

Γενικά παρατηρούμε ότι υπάρχει σαφής καθυστέρηση διαπίστωσης μακροσκοπικώς, της ύπαρξης ορατών όγκων στην Ομάδα Θεραπείας ως προς την Ομάδα Ελέγχου. Επίσης παρατηρούμε αύξηση των χρόνων πλήρους ανάπτυξης των όγκων στην Ομάδα Θεραπείας. Γενικότερα ο λόγος: Ρυθμός Ανάπτυξης Όγκων = Μέσο Βάρος Όγκων / Μέσο Χρόνο Ανάπτυξης Όγκων είναι για την μεν Ομάδα Ελέγχου ίση προς 1,5 g / ημέρα, ενώ για την Ομάδα Θεραπείας είναι ίσος προς 0,64 g / ημέρα.

Δ(6). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΠΟΥ ΑΝΕΠΤΥΞΑΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΜΕ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ B[a]P ΥΠΟΔΟΡΙΩΣ.

Γενικά η χορήγηση του εν λόγω υδατικού εκχυλίσματος έδωσε θετικά αποτελέσματα στην ομάδα των επίμυων, στην οποία άρχισε να δίνεται από την στιγμή που το μέγεθος του όγκου είχε μόλις υπερβεί το μέγεθος των 2Χ2 cm. Η συνολική μέση επιβίωση των ζώων έφτασε στις 222 ± 24 ημέρες, σε σύγκριση με την Ομάδα Ελέγχου όπου η μέση επιβίωση των ζώων είναι ίση προς 180 ± 34 ημέρες.

Δ(7). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΠΟΥ ΚΑΤΕΣΤΗΣΑΝ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΕΙΣ ΜΕΣΩ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ B[a]P.

Τα δεδομένα του πειράματος δείχνουν τα εξής:

1^{ον}) Όλοι οι επίμυες Wistar τόσο της Ομάδας Ελέγχου όσο και της Ομάδας Θεραπείας ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους οι οποίοι δημιουργήθηκαν στο σημείο της έγχυσης του B[a]P.

2^{ον}) Οι όγκοι της Ομάδας Ελέγχου ήσαν συνολικά μεγαλύτεροι από τους όγκους της Ομάδας Θεραπείας.

3^{ον}) Υπήρξε μια μεγαλύτερη συχνότητα θανάτων στην Ομάδα Θεραπείας, η οποία δεν αποδόθηκε σε τοξικότητα του εκχυλίσματος, αλλά σε τοξίνωση οφειλόμενη στην ταχεία νέκρωση και τήξη του κυτταρικού περιεχομένου των όγκων, όπως επίσης σε αιμορραγίες οφειλόμενες σε αναστολή της λειτουργίας των αιμοπεταλίων ή σε φαινόμενα διάχυτης ενδαγγειακής πήξης. Τα δεδομένα αυτά φαίνονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17

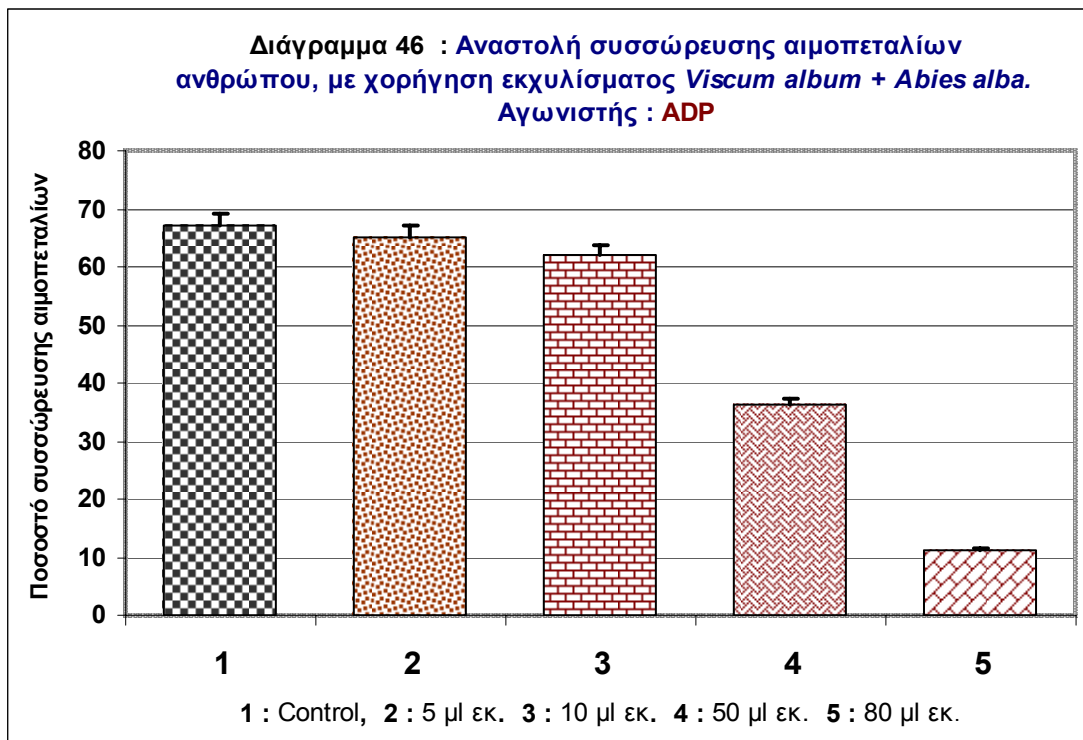
	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		ΟΜΑΔΑ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	
A / A Ζώου	Βάρη όγκων Ομάδας Ελέγχου	Παθολογο ανατομική διάγνωση και Grade	Βάρη όγκων Ομάδας Θεραπείας	Παθολογο ανατομική διάγνωση και Grade
1	77,82	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade III	39,58	Πολύμορφο ιστοκύττωμα Grade III
2	23,07	Πολύμορφο ιστοκύττωμα Grade III	47,18	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade III
3	64,62	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade II	5,59	Ινοσάρκωμα Grade II
4	37,62	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade III	6,61	Πολύμορφο ιστοκύττωμα Grade III
5	56,05	Ραβδομυοσάρκωμα Grade III	39,38	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade III
6	124,77	Ινοσάρκωμα Grade III	86,72	Ατρακτοκυτταρικός - Ιστοκυτταρικός όγκος Grade III
7	67	Ατρακτοκυτταρικός όγκος Grade III	Όχι όγκος	—
8	55,72	Ινοσάρκωμα Grade III	Όχι όγκος	—
Average ± SD	67 ± 30		37,5 ± 30	

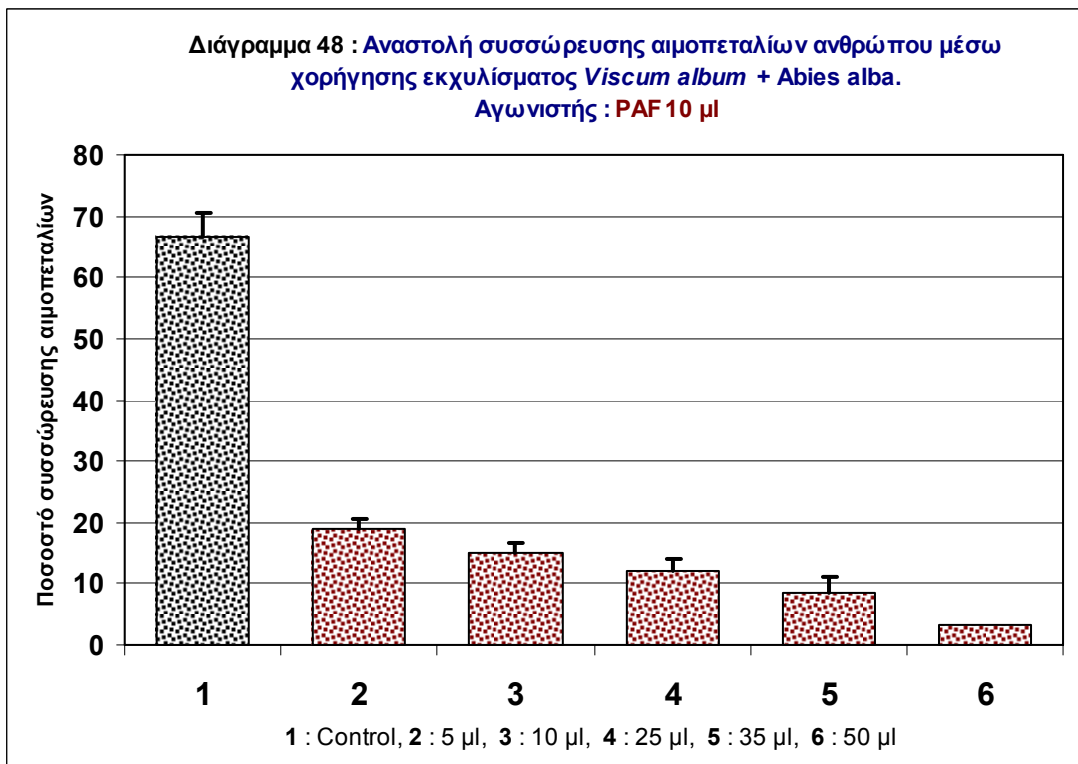
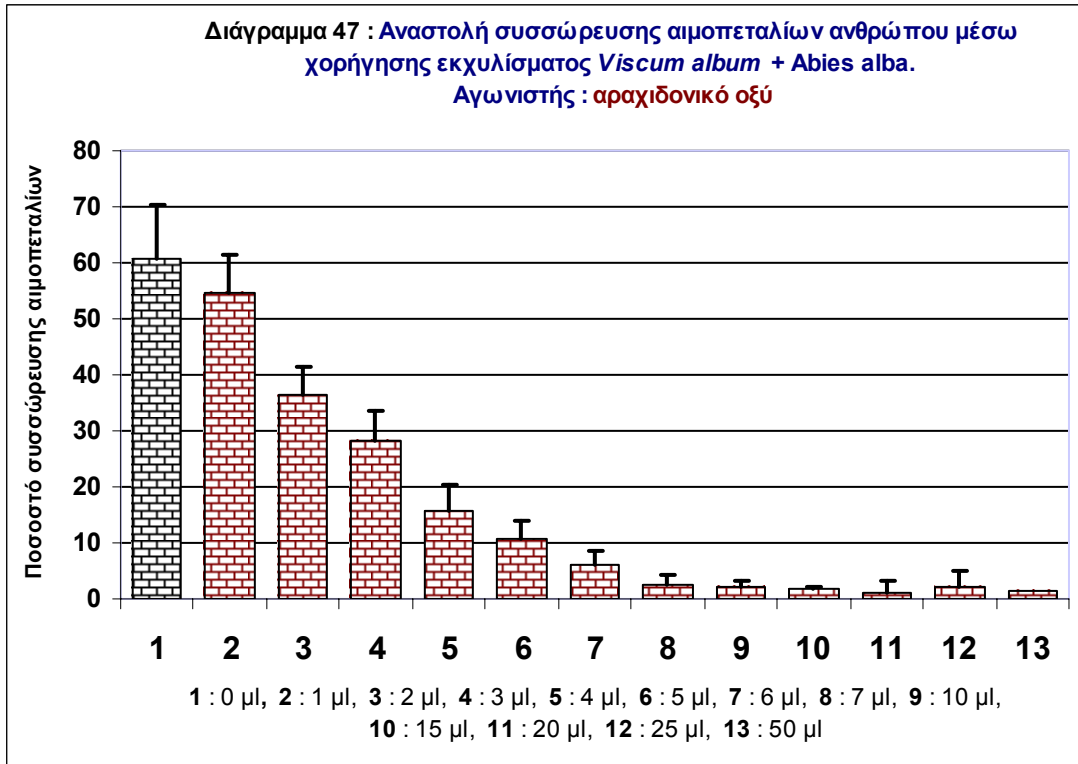
Στο Παράρτημα II (Σελίδα 373 – 381), υπάρχει φωτογραφικό υλικό με διάφορα παθολογοανατομικά ευρήματα (Φωτογραφίες από 35 έως και 50).

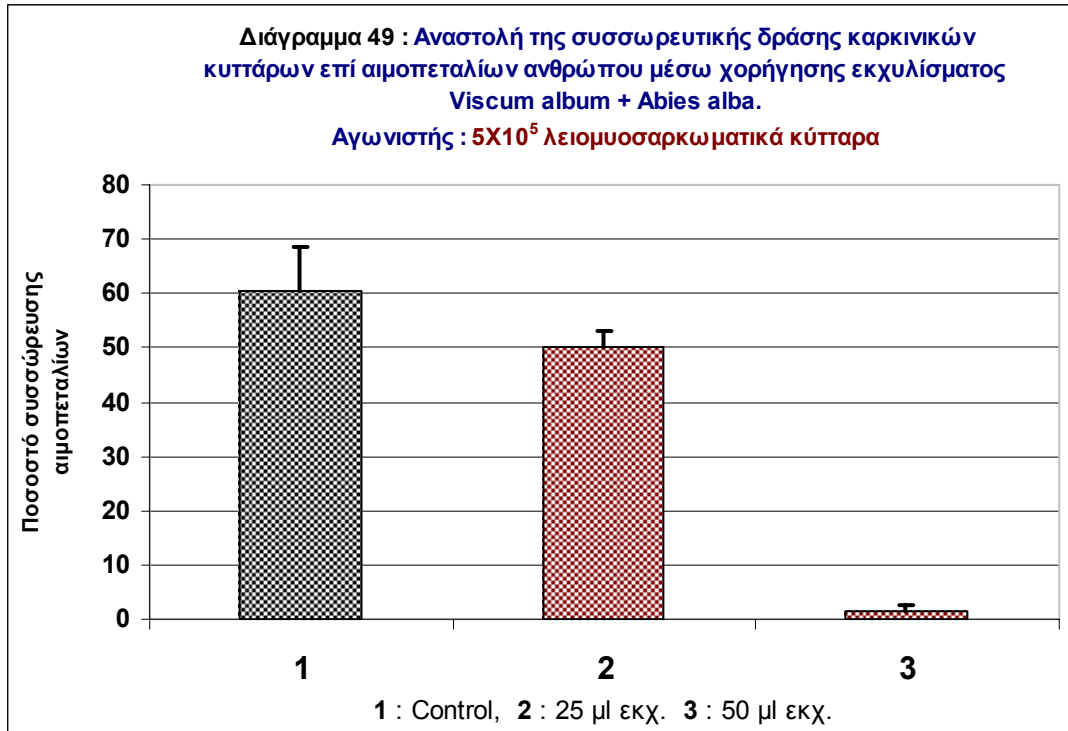
Ε(1). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΤΗΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ.

1) Λειτουργικές απαντήσεις των αιμοπεταλίων σε σχέση με το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών.

A) Το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba* αναστέλλει γενικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αλλά ενδεχομένως είναι περισσότερο εκλεκτική για την οδό του αραχιδονικού οξέος και κατόπιν του PAF. Η συσσώρευση που προκαλεί το ADP στα αιμοπετάλια ex vivo του ανθρώπου αναστέλλεται επίσης από το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών, αλλά απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες εκχυλίσματος. Τέλος το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών αναστέλλει απολύτως και την συσσώρευση που προκαλούν στα αιμοπετάλια του ανθρώπου ex vivo, καθορισμένοι αριθμοί νεοπλασματικών κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar. Οι ανασταλτικές δράσεις των εκχυλισμάτων επί των αγωνιστών των τριών δρόμων της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (οδός ADP, οδός αραχιδονικού οξέος, οδός PAF), όπως επίσης και επί της συσσωρευτικής δράσης των νεοπλασματικών κυττάρων, επί των αιμοπεταλίων, φαίνεται στα διαγράμματα 46, 47, 48 και 49.







Πρέπει να σημειωθεί ότι στα εν λόγω πειράματα τα παρασκευάσματα των αιμοπεταλίων είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία με την οποία οι δύο οδοί συσώρευσης είχαν αποκλειστεί από κατάλληλους αναστολείς, εξειδικευμένους για τις συγκεκριμένες οδούς που έπρεπε να αποκλειστούν, προκειμένου να δειχθεί αν το εκχύλισμα εμφάνιζε κάποια εκλεκτικότητα στην ανασταλτική του ικανότητα.

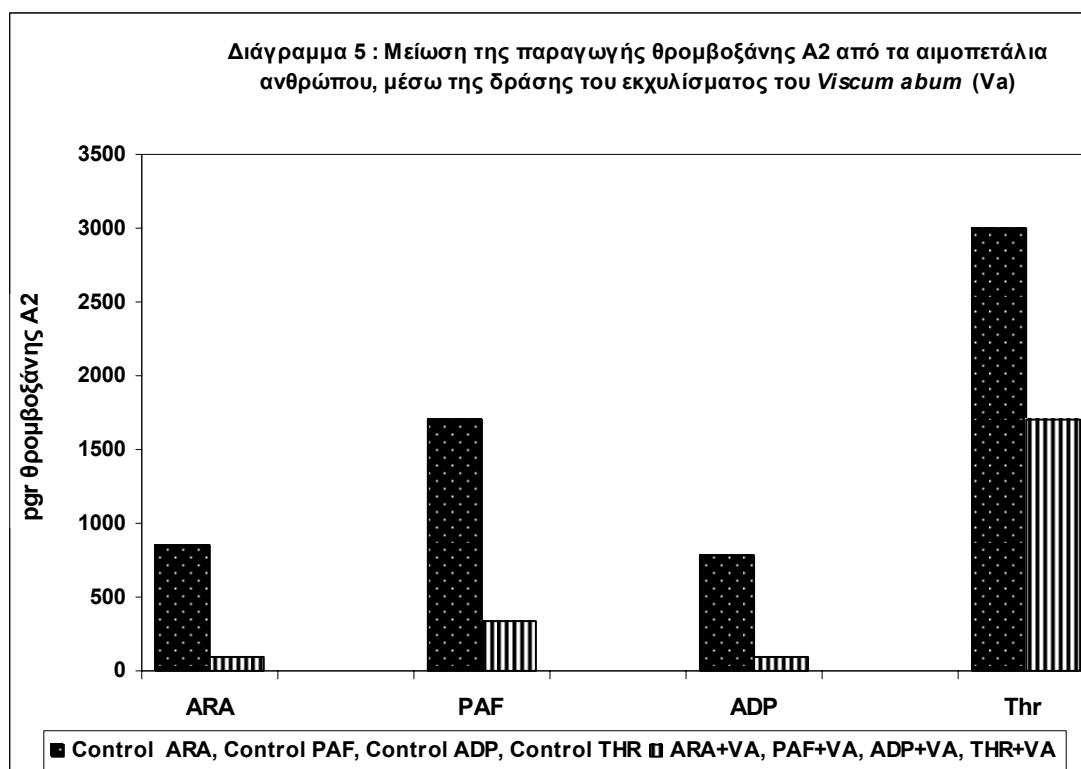
Από τα δεδομένα που προέκυψαν, η σειρά δραστηριότητας του εκχυλίσματος ήταν η εξής: αραχιδονικό οξύ < PAF < ADP < σαρκωματικά κύτταρα. Όπως θα δούμε παρακάτω φαίνεται ότι η συσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo* σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την οδό του αραχιδονικού οξέος.

B) Η χορήγηση του μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba* σε αιμοπετάλια ανθρώπου, στις δόσεις οι οποίες προκαλούν πλήρη αναστολή της συσώρευσης αυτών, προκαλεί επίσης πολύ μεγάλη αναστολή της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 (TXA_2).

Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι η συσώρευση των αιμοπεταλίων αναστέλλεται εκ μέρους του μικτού εκχυλίσματος, λόγω αναστολής της κυκλοξυγονάσης-1 (COX-1), ή εν γένει κάποιου σημαντικού βήματος της

πορείας του αραχιδονικού οξέος. Σε όλες τις περιπτώσεις των χρησιμοποιούμενων αγωνιστών, δηλαδή του αραχιδονικού οξέος (ARA), του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) και της θρομβίνης (THR), η χορήγηση εκχυλίσματος στα αιμοπετάλια προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής θρομβοξάνης, αιτιολογώντας έτσι την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Στα πειράματα που εμφανίζονται στο κατωτέρω διάγραμμα, η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου εκχυλίσματος είναι ίση προς 50 μl (5 mg).

Διάγραμμα 50



Γ) Πολύ σημαντική είναι η διαπίστωση ότι τα τιτλοποιημένα εκχυλίσματα των φυτών *Viscum album* και *Abies alba* αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τα νεοπλασματικά κύτταρα λειομυοσαρκόματος επίμυος Wistar. Τα κακοήθη αυτά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύουν τα αιμοπετάλια τόσο του ανθρώπου, όσο του κουνελιού και του επίμυος. Γενικά τα κακοήθη κύτταρα προκαλούν αιμοπεταλιακή συσσώρευση και η εν λόγω δράση θεωρείται ότι ευθύνεται για την μεταστατική διασπορά των νεοπλασμάτων μέσω του αίματος.

Η χορήγηση αναστολέων της κυκλοξυγονάσης-2 (COX-2) και της λιποξυγονάσης (LOX) προκαλεί μικρή αναστολή της συσσωρευτικής δράσης

των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Το ίδιο παρατηρείται με την χορήγηση αναστολέων της οδού του PAF. Ωστόσο η χορήγηση ινδομεθακίνης, η οποία αποτελεί έναν ειδικό αναστολέα της κυκλοξυγονάσης-1, αναστέλλει ισχυρά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου που προκαλείται από τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα. Το τελευταίο αυτό δεδομένο υποδεικνύει ότι η συσσωρευτική δράση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επί των ανθρώπινων αιμοπεταλίων σχετίζεται με την διέγερση της αιμοπεταλιακής κυκλοξυγονάσης-1 (COX-1).

Οι κύριες ενδείξεις για τον εντοπισμό της οδού συσσώρευσης δια της οποίας δρουν τα νεοπλασματικά κύτταρα του λειομυοσαρκώματος επίμυος για την πρόκληση συσσώρευσης στα αιμοπετάλια προκύπτουν από τα ακόλουθα πειραματικά δεδομένα:

1^{ον}) Σε αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί αντιστοίχως η οδός του PAF και του ADP, ενώ έχει μείνει ανοιχτή μόνο η οδός του αραχιδονικού οξέος, η εφ' άπαξ προσθήκη 5×10^6 λειομυοσαρκωματικών κυττάρων σε PRP όγκου 500 μl, προκαλεί υψηλή και μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου Εικόνα 3.

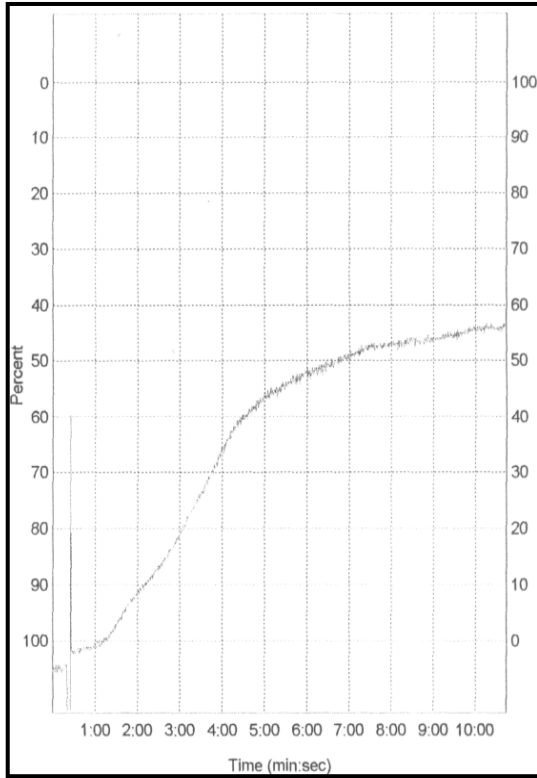
2^{ον}) Η μορφολογία της συσσώρευσης – ύπαρξη ενός συσσωρευτικού κύματος α και ενός κύματος β – υποδεικνύει ότι η συσσώρευση άγεται μέσω της οδού του αραχιδονικού οξέος Εικόνα 4.

3^{ον}) Από την άλλη πλευρά σε αιμοπετάλια των οποίων έχουν αποκλειστεί ταυτοχρόνως η οδός του PAF και του αραχιδονικού οξέος, η προσθήκη των νεοπλασματικών κυττάρων στο PRP δεν προκαλεί αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Το ίδιο φαινόμενο της παρεμπόδισης της συσσώρευσης παρατηρείται στα αιμοπετάλια στα οποία έχουν αποκλειστεί ταυτοχρόνως η οδός του ADP και του αραχιδονικού οξέος. Η ισχυρότερη λειτουργική ένδειξη ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα προκαλούν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της οδού του αραχιδονικού οξέος προκύπτει από το γεγονός ότι και μόνον ο αποκλεισμός της αραχιδονικής οδού με ασπιρίνη (ενώ οι αντίστοιχες του PAF και ADP είναι ανοιχτές) αρκεί, για να επιφέρει την πλήρη αναστολή της συσσωρευτικής δράσης των κυττάρων του

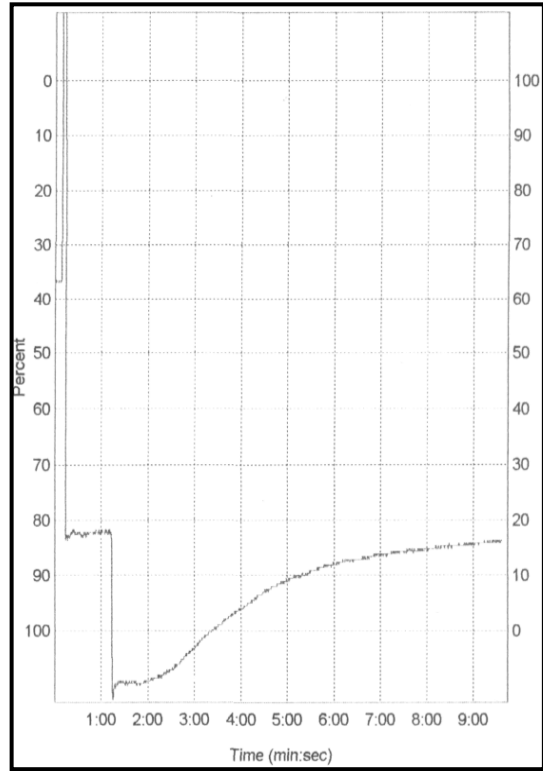
λειομυοσαρκώματος. Τα ανωτέρω δεδομένα φαίνονται στον πίνακα 18, όπως επίσης στα διαγράμματα 50, και 51 και στις εικόνες 3,4,5.

4^{ον}) Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα ενώ πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας παράγουν μεταβολίτες της αραχιδονικής οδού. Οι μεταβολίτες που μετρήθηκαν αντιπροσωπεύονται από την θρομβοξάνη (TXA₂, TXB₂) και την προσταγλανδίνη E₂ (PGE₂) τόσο στο καλλιεργητικό μέσο, όσο και στην μάζα των κακοηθών κυττάρων. Η μέτρηση των δύο προστανοειδών μορίων έγινε 48 ώρες μετά την σπορά των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, με την μέθοδο που προσδιορίζουμε στο αντίστοιχο σημείο της διατριβής. Η ποσότητα της θρομβοξάνης που υπάρχει στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (1 ml εναιωρήματος λειομυοσαρκωματικών κυττάρων εμπεριέχουν περί τα 5X10⁶ κύτταρα) είναι ίση προς 10.000 pg μίγματος θρομβοξάνης B₂ και θρομβοξάνης A₂. Δεδομένου ότι η διάρκεια ημιζωής της θρομβοξάνης A₂ είναι μικρότερη των πέντε λεπτών, ενώ η θρομβοξάνη B₂ είναι σταθερότερο μόριο, η μεγαλύτερη ποσότητα θρομβοξάνης, που μετρήθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα, είναι TXB₂. Η ποσότητα της θρομβοξάνης στο καλλιεργητικό υγρό είναι ίση προς 130 pg. Η εν λόγω ποσότητα δεν είναι σε θέση να εισάγει αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Επίσης η ποσότητα των 10.000 pg θρομβοξάνης αν αντιστοιχούσε σε TXA₂, θα οδηγούσε σε μια αιμοπεταλιακή συσσώρευση μεγαλύτερη από εκείνη της θρομβίνης, η οποία παράγει από τα αιμοπετάλια που περιέχονται σε 0,5 ml PRP, μια ποσότητα θρομβοξάνης ίση περίπου με 3.000 pg.

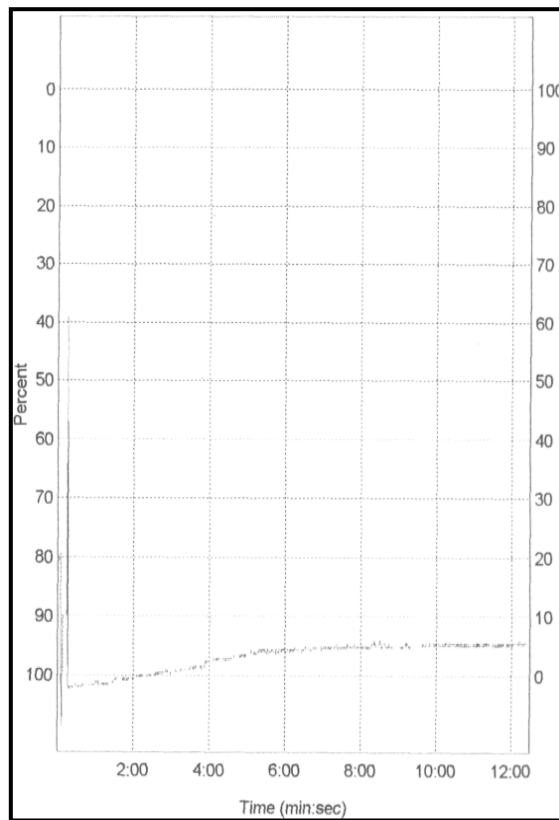
Είναι απαραίτητο η εν λόγω μελέτη να εμβαθύνει μέσα στο πλαίσιο μιας μεταδιδακτορικής έρευνας, προκειμένου να διευκρινίσουμε με πλήρη καθαρότητα τον μηχανισμό της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τα συγκεκριμένα νεοπλασματικά κύτταρα, όπως επίσης και το ποια είναι τα συστατικά των δύο φυτών, τα οποία ευθύνονται για την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από τα κύτταρα του λειομυοσαρκώματος. Οι μετρήσεις που έγιναν αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους πολλών δειγμάτων αιμοπεταλίων ανθρώπου που συσσωρεύτηκαν με 500.000 λειομυοσαρκωματικά κύτταρα ανά συσσωρευτική δοκιμή (μέθοδος pool) .



Εικόνα 3



Εικόνα 4

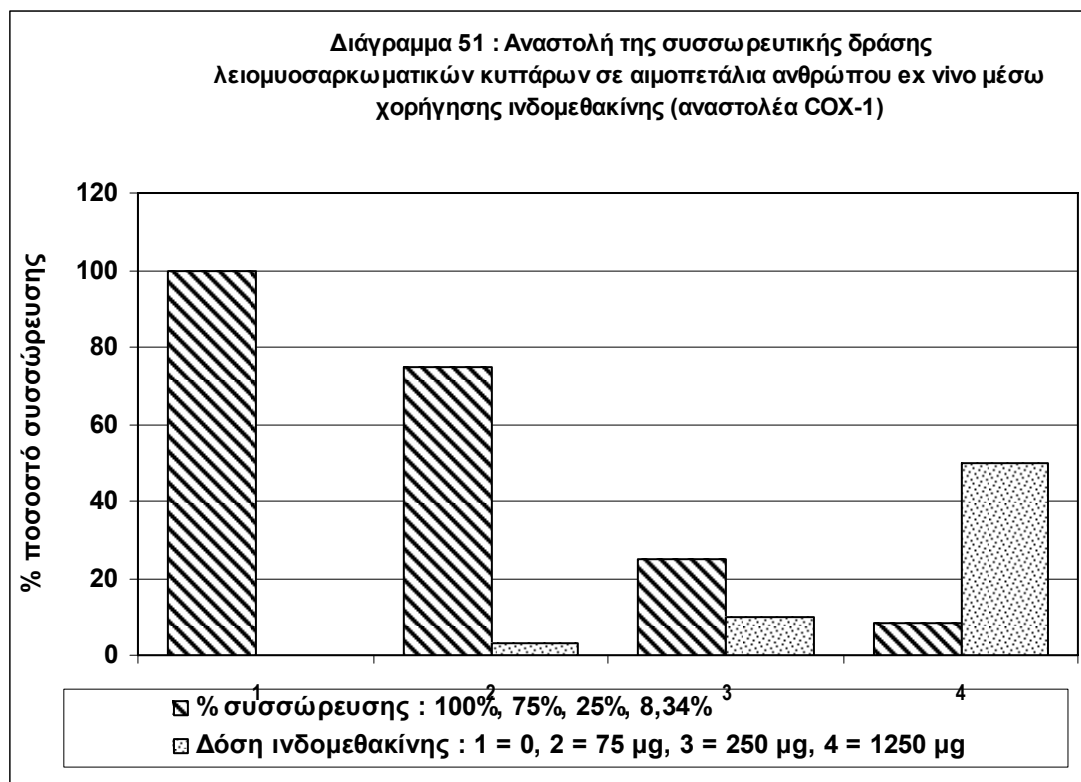


Εικόνα 5

Οι SD των μετρήσεων δεν παρατίθενται στον πίνακα εξ αιτίας του γεγονότος ότι είναι πολύ μικρές.

	TXB₂ – TXA₂	PGE₂	
Κύτταρα LMS (5X10 ⁶)	10.000 pg / ml	3000 pg / ml	Ινδομεθακίνη = 0 µg
Καλλιεργητικό μέσο (DMEM)	120 pg / ml	80 pg / ml	Ινδομεθακίνη = 0 µg
PRP	110 pg / ml	75 pg / ml	Ινδομεθακίνη = 0 µg
PRP + 5X10 ⁶ κύτταρα LMS	1100 pg / ml	700 pg / ml	Ινδομεθακίνη = 0 µg

Πίνακας 18: Επίπεδα TXB₂ – TXA₂ και PGE₂ σε κατακρημνισμένα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα (LMS), κατόπιν καλλιέργειας 48 ωρών, στο καλλιεργητικό τους μέσον, όπως επίσης σε μη θρομβωμένο και σε θρομβωμένο PRP με τον εν λόγω τύπο νεοπλασματικών κυττάρων. Κατά την διάρκεια των μετρήσεων δεν χορηγήσαμε ινδομεθακίνη, ώστε η παραγωγή αραχιδονικών μεταβολιτών να μην παρεμποδίζεται.



Δ) Τα μικτά εκχυλίσματα των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba* αναστέλλουν την αιμοπεταλιακή συσσώρευση και μειώνουν την παραγωγή θρομβοξάνης εκ μέρους όλων των χρησιμοποιηθέντων αγωνιστών, όπως και εκ μέρους των νεοπλασματικών κυττάρων. Πάντως δεν μας είναι γνωστή η φύση του συστατικού ή των συστατικών του φυτού, που προκαλούν την αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Επίσης δεν γνωρίζουμε αν οι αντιαιμοπεταλιακές *ex vivo* και οι αντικαρκινικές *in vitro* ιδιότητες των εν λόγω φυτών συνδέονται μεταξύ τους, ή προκαλούνται από τα ίδια φυτικά συστατικά ή συνδυασμό αυτών.

Ε(2). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ 5-ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ (5-LOX).

I. Εκχύλισμα μη κατεργασμένο

Τα τιτλοποιημένα μικτά εκχυλίσματα των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba* έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την αντίδραση του ενζύμου 5 – λιποξυγονάση (5–LOX) με το λινελαϊκό οξύ ως υπόστρωμα αυτού.

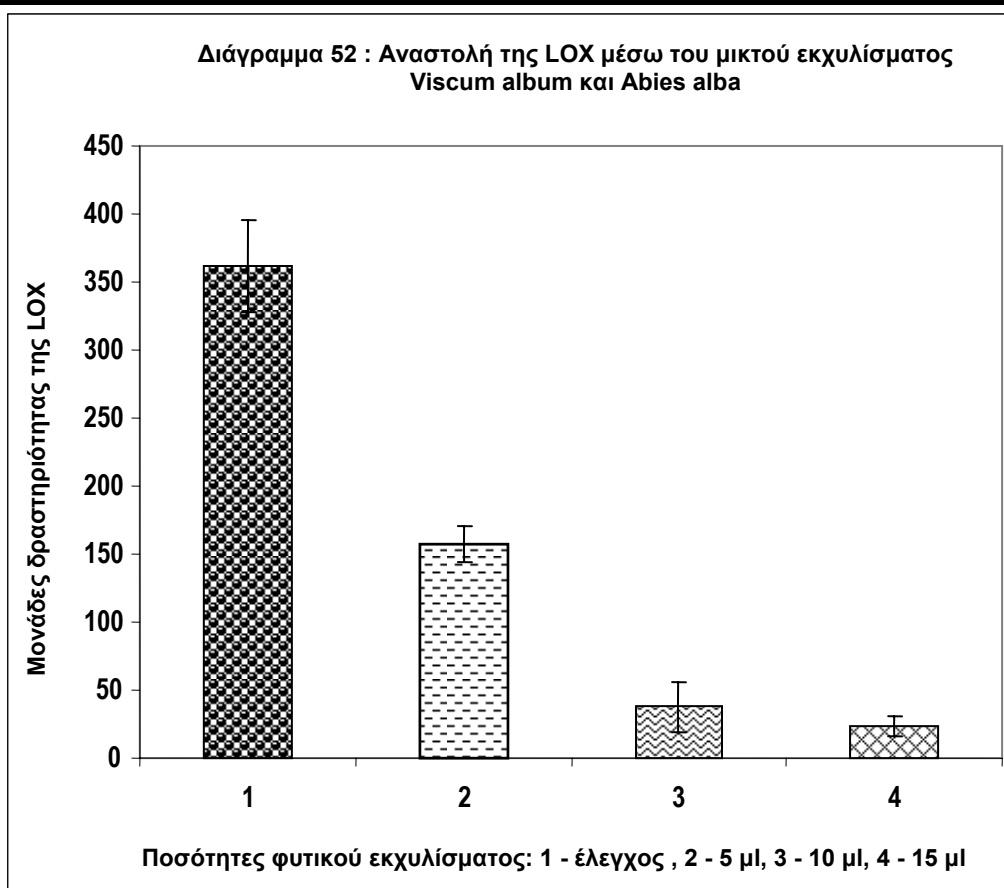
Η δοκιμή της ανασταλτικής δράσης του εκχυλίσματος έλαβε χώρα μετά την πλήρη απομάκρυνση της αιθυλικής αλκοόλης, δηλαδή υπό το καθεστώς ολοκληρωτικής ξήρανσης του εκχυλίσματος σε ρεύμα αζώτου και κατόπιν εκ νέου διάλυσης του σε δισαπτεσταγμένο νερό, ακολουθούμενη από διήθησή του για την απομάκρυνση των χονδροειδών, μη διαλυμένων υλικών (περιγραφή στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι).

Μικρές ποσότητες του παρασκευασμένου εκχυλίσματος, τοποθετούνταν στην κυψελίδα όπου λάμβανε χώρα η αντίδραση της λιποξυγονάσης και ταυτοχρόνως η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 234 nm.

Στον πίνακα 19 που ακολουθεί έχουμε μια αναλυτική παρουσίαση των δεδομένων αναστολής της 5-λιποξυγονάσης από μια σειρά ποσοτήτων ανασυσταθέντος εκχυλίσματος, που είναι πολλαπλάσιες της ποσότητας αυτού που περιέχεται σε 1 μl (0,03589 mg/μl ή κατά προσέγγιση 0,036mg/μl). Στο διάγραμμα 52, που ακολουθεί, έχουμε μια συνολική εικόνα της ανασταλτικής ισχύος του εν λόγω εκχυλίσματος, συναρτήσει της αυξανόμενης ποσότητας του εκχυλίσματος .

Πίνακας 19

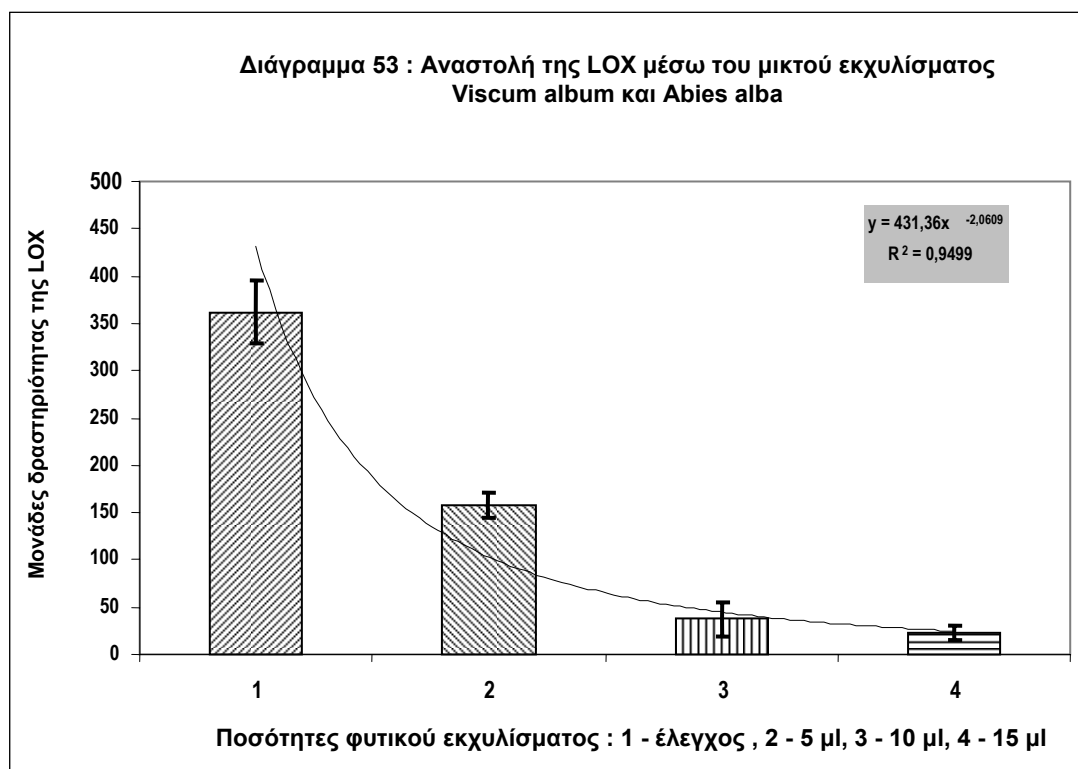
Ποσότητα εκχυλίσματος (mg)/ml	Δραστηριότητα 5-λιποξυγονάσης (units)	Ποσοστό δραστηριότητας	Ποσοστό αναστολής
0 mgr (control)	362,16 ± 34,3	100 %	0 %
0,06 mg	157,5 ± 13,5	43,5 %	56,5 %
0,12 mg	37,75 ± 18,3	10,4 %	89,6 %
0,18 mg	23 ± 7,25	6,35 %	93,64 %



Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα 52, στην στήλη αρ. 1 φαίνεται η συνολική δραστηριότητα της λιποξυγονάσης, βάσει της αύξησης της οπτικής απορρόφησης στα 234 nm, συναρτήσεως του χρόνου, η οποία προκύπτει από την μετατροπή του λινελαϊκού οξέος σε ένα υπεροξειδωμένο παράγωγο αυτού (HETE).

Η εν λόγω δραστηριότητα εκφράζεται σε ποσότητα μονάδων της λιποξυγονάσης, δηλαδή σε μάζα του ενζύμου που προκαλεί αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 234 nm κατά 0,001 ανά min σε θερμοκρασία 25° C

και $\text{pH} = 9$. Το διάγραμμα δείχνει ότι ο μέσος όρος δραστηριότητας της 5-LOX, ανά δείγμα ελέγχου, είναι 362 ± 34 μονάδες, απουσία του οποιουδήποτε αναστολέα. Η προσθήκη 5 μl ανασυσταθέντος εκχυλίσματος στο διάλυμα της αντίδρασης προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του εν λόγω ενζύμου στο 43,489 % της δραστηριότητας του μέσου όρου των ελέγχων αυτού (αναστολή 56,5 %). Η προσθήκη 10 μl εκχυλίσματος προκαλεί μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στο 10,4 % της δραστηριότητας του μέσου όρου των ελέγχων (αναστολή 89,6 %). Τέλος η προσθήκη 15 μl ανασυσταθέντος εκχυλίσματος του φυτού έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας στο 6,35 % της δραστηριότητας του μέσου όρου των ελέγχων (αναστολή 93,64 %). Από την ανάλυση των δεδομένων μας προκύπτει ότι, η εξίσωση που περιγράφει, με την μεγαλύτερη δυνατή προσέγγιση, το φαινόμενο της αναστολής της 5-λιποξυγονάσης, από το ανασυσταθέν μικτό φυτικό εκχύλισμα, είναι μια εξίσωση, όπου ο άγνωστος x φέρει αρνητικό εκθέτη με ακέραιο και δεκαδικό μέρος (-2,0609). Η εν λόγω εξίσωση παριστάνει μια υπερβολή, όπως φαίνεται στην εικόνα 1(β).



Η συγκέντρωση μάζας στο ξηρανθέν εκχύλισμα αντιστοιχεί στα 0,036 mg ανά μl , κατά προσέγγιση τρίτου δεκαδικού στοιχείου. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα αναστολής της 5-LOX ήσαν, συνεπώς, 0,06

mg/ml, 0,12 mg/ml 0,36 mg/ml. Η εξίσωση που περιγράφει την δράση του εκχυλίσματος επί της αντίδρασης της 5-LOX είναι η εξής: $y = 431,36 x^{-2,0609}$
ή $y = 431,36/x^{2,0609}$

Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα 53 το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών *Viscum album* και *Abies alba* αναστέλλει την 5-λιποξυγονάση με έναν τρόπο ο οποίος δεν εμφανίζει γραμμικότητα: ο διπλασιασμός της ποσότητας του ανασταλτικού παράγοντα προκαλεί αναστολή σχεδόν υπέρ-τετραπλάσια σε σύγκριση με την αναστολή που προκαλεί η αρχική ποσότητα αυτού (πράγμα το οποίο επαληθεύει την εξίσωση). Το δεδομένο αυτό παραπέμπει σε μια αντίδραση αναστολής δευτέρας τάξεως. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλαπλασιαστική αύξηση της δράσης με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Αλλά ενδεχομένως υποδεικνύει την ανάπτυξη μιας συνέργιας μεταξύ των μορίων που προκαλούν την αναστολή και τα οποία είναι, ενδεχομένως, περισσότερα του ενός είδους. Δηλαδή δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο η αναστολή της 5-λιποξυγονάσης να οφείλεται σε περισσότερα από ένα είδος διαφορετικών μορίων, τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν μια συνέργια μεταξύ τους, προκειμένου να εισάγουν την αναστολή του ενζύμου.

Οι χημικοί παράγοντες του εκχυλίσματος, που προκαλούν την αναστολή της 5-λιποξυγονάσης, εμφανίζουν μια μικρή αύξηση της δράσης τους μέσω βρασμού διάρκειας 30 λεπτών. Η τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε ζέον υδατόλουτρο επί μισή ώρα επιφέρει στις περισσότερες χρησιμοποιηθείσες δόσεις μια μικρή αύξηση της ικανότητάς του εκχυλίσματος να αναστέλλει την 5-λιποξυγονάση, όπως φαίνεται από τον επισυναπτόμενο πίνακα 20.

Τα δεδομένα που υπάρχουν στην διάθεσή μας δεν είναι επαρκή προκειμένου να προσδιορίσουμε τον τύπο της αναστολής. Απαιτείται περισσότερη μελέτη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικών με τον συγκεκριμένο τύπο αναστολής, που εισάγει το εκχύλισμα των *Viscum album* και *Abies alba*.

Πίνακας 20

Ποσότητα εκχυλίσματος (mg/ml)	Δραστηριότητα ενζύμου με κανονικό εκχύλισμα (u.i)	Ποσοστό δραστηριότητας	Ποσοστό αναστολής	Δραστηριότητα ενζύμου (βρασμός εκχυλίσματος)	Ποσοστό δραστηριότητας	Ποσοστό αναστολής
0	362,16 ± 34,3	100 %	0 %	362,16 ± 34,3	100%	0 %
0,06	157,5 ± 13,5	43,5 %	56,5 %	126,08 ± 4,23	34,8 %	65,2 %
0,12	37,75 ± 18,3	10,4 %	89,6 %	49,07 ± 3	13,55 %	86,45 %
0,18	23 ± 7,25	6,35 %	93,65 %	20,9 ± 4,06	5,77 %	94,23 %

Ε(3). ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝΤΟΣ ΔΙΑ ΥΔΑΤΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΕΠΙ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΦΟΝΙΚΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (NKCs) ΑΝΘΡΩΠΩΝ.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη των δράσεων του συνολικού μικτού εκχυλίσματος *Viscum album* και *Abies alba* δείχνουν ότι το εκχύλισμα ασκεί ευεργετικές δράσεις ενίσχυσης της κυτταροτοξικής ικανότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων εναντίον καρκινικών κυττάρων K – 562. Και στις 12 περιπτώσεις των υγιών εθελοντών των οποίων μελετήσαμε τις κυτταροτοξικές αντιδράσεις των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NK), διαπιστώθηκε ισχυρή αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους μετά την έκθεσή τους στο εκχύλισμα. Συνολικά οι δράσεις του εκχυλίσματος δείχνουν ότι η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων που παρατηρήθηκε, μετά από χορήγηση μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, κατά μέσο όρο είναι $340 \pm 21 \%$, $165 \pm 25 \%$ και $73,5 \pm 16 \%$ ($p < 0.05$) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντιστοίχως (Πίνακας 21 διαγράμματα 54 – 55 – 56) Το μικτό εκχύλισμα από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο $9,1 \pm 21 \%$ στα κύτταρα K – 562.

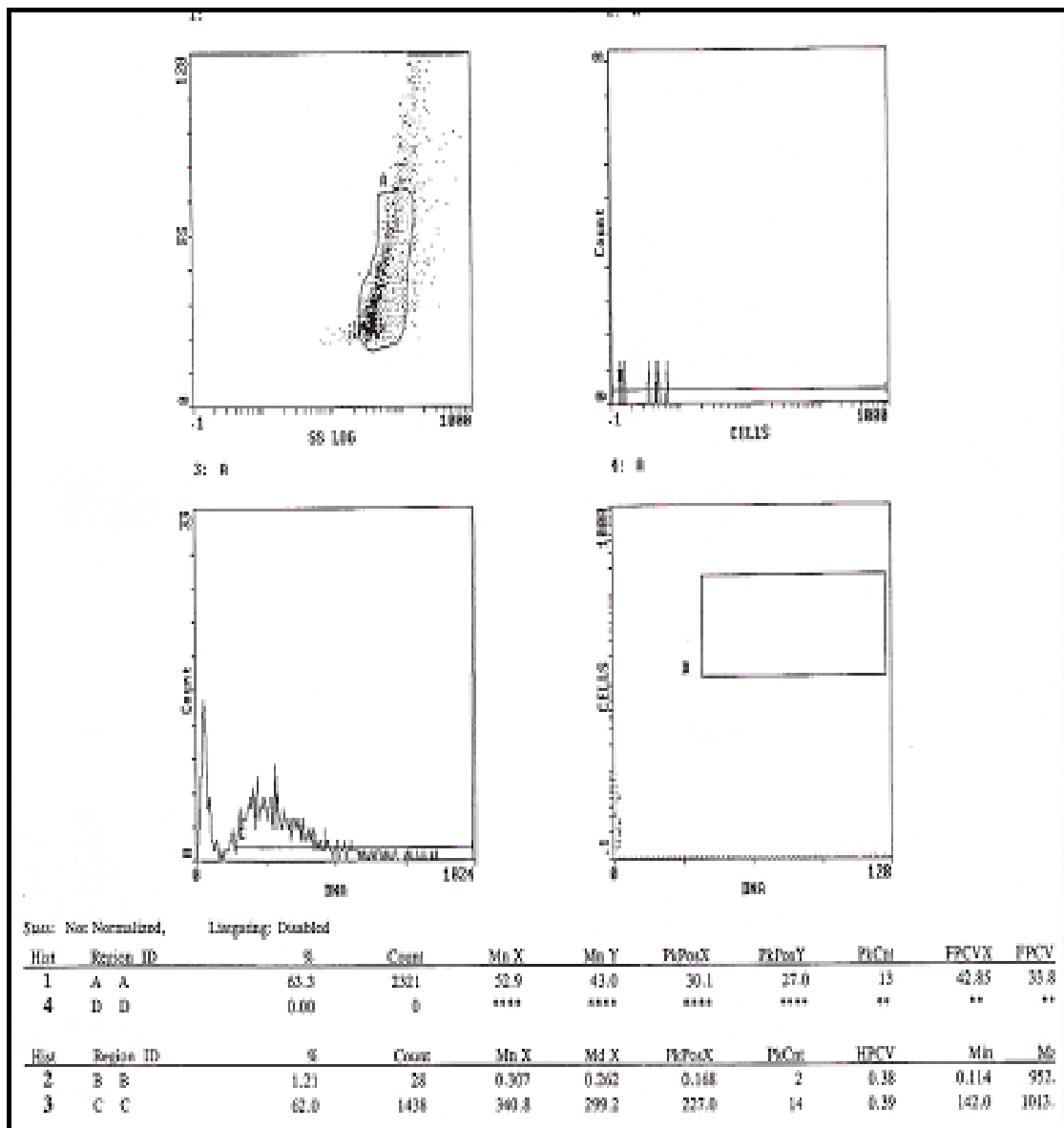
Όπως παρατηρούμε από τα δεδομένα των πειραμάτων υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ απόλυτου αριθμού των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων.

Πίνακας 21: Αύξηση της λειτουργικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NK - λεμφοκύτταρα) εκφρασμένη σε εκατοστιαία ποσοστά, κατόπιν επώασής τους με το μικτό εκχύλισμα των φυτών *V. album* + *A. alba*.

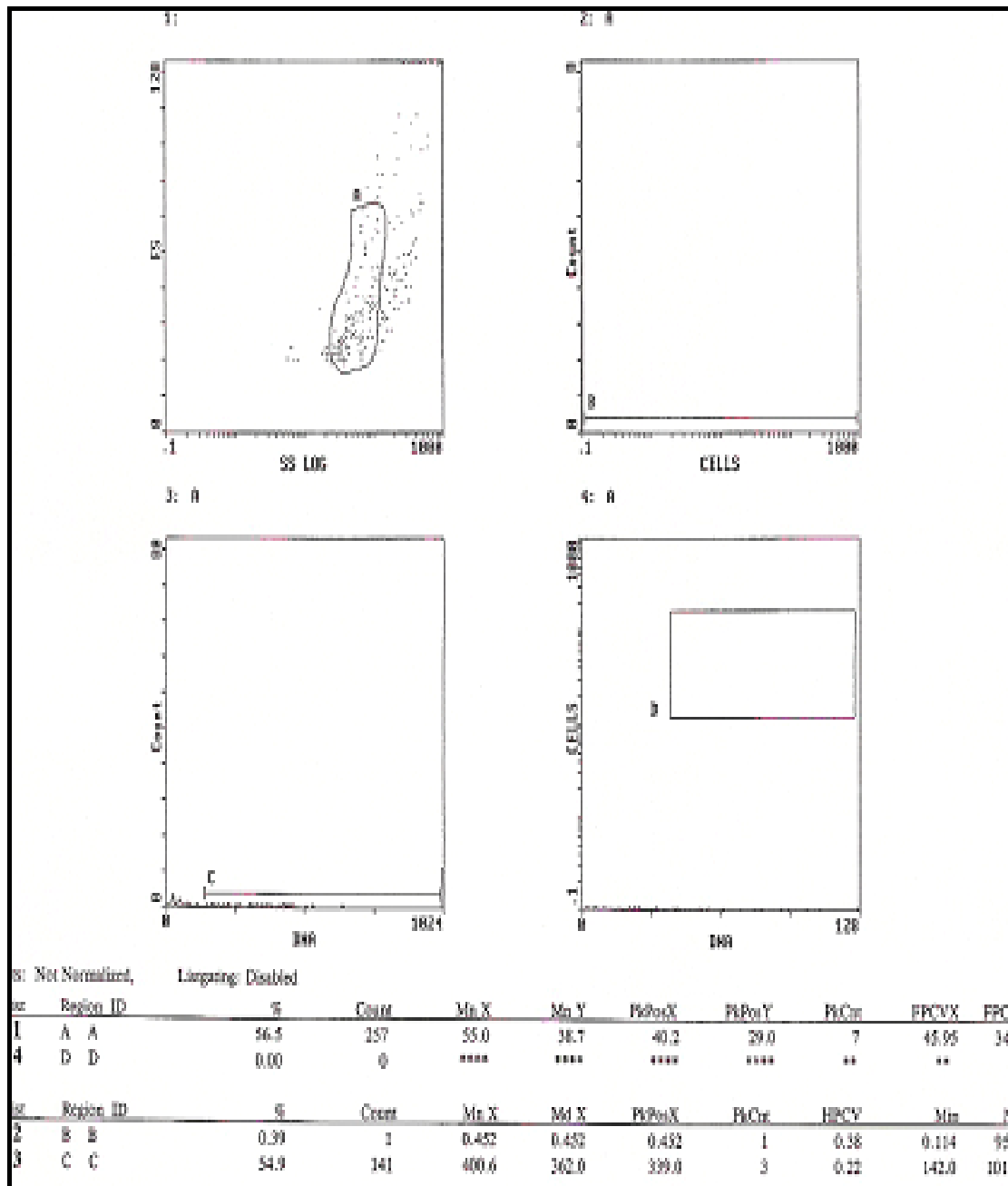
A / A Εθελοντών	Αναλογία δραστικών κυττάρων προς τα κύτταρα στόχους: 12,5 : 1	Αναλογία δραστικών κυττάρων προς τα κύτταρα στόχους: 25 : 1	Αναλογία δραστικών κυττάρων προς τα κύτταρα στόχους: 50 : 1	Κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος στα καρκινικά κύτταρα (K – 562) (%)
	Ποσοστό κυτταρο τοξικότητας NK με εκχύλισμα (%)	Ποσοστό κυτταρο τοξικότητας NK με εκχύλισμα (%)	Ποσοστό κυτταρο τοξικότητας NK με εκχύλισμα (%)	
1	356	175	47	8,8
2	380	155	72	8,4
3	329	145	88	8,7
4	316	202	81	10,3
5	325	167	75	9,5
6	357	134	48	9,3
7	342	162	95	8,2
8	305	165	65	9,1
9	354	196	86	9,7
10	334	201	91	10,1
11	355	135	76	9,2
12	328	139	58	8,1
Average ± SD	340 ± 21	164,7 ± 25	73,5 ± 16,1	9,1 ± 0,7

Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος των δύο φυτών προκαλεί πάντα αύξηση της κυτταροτοξικής ικανότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων, δηλαδή σε όλες τις αναλογίες δραστικών κυττάρων εναντίον των κυττάρων στόχων.

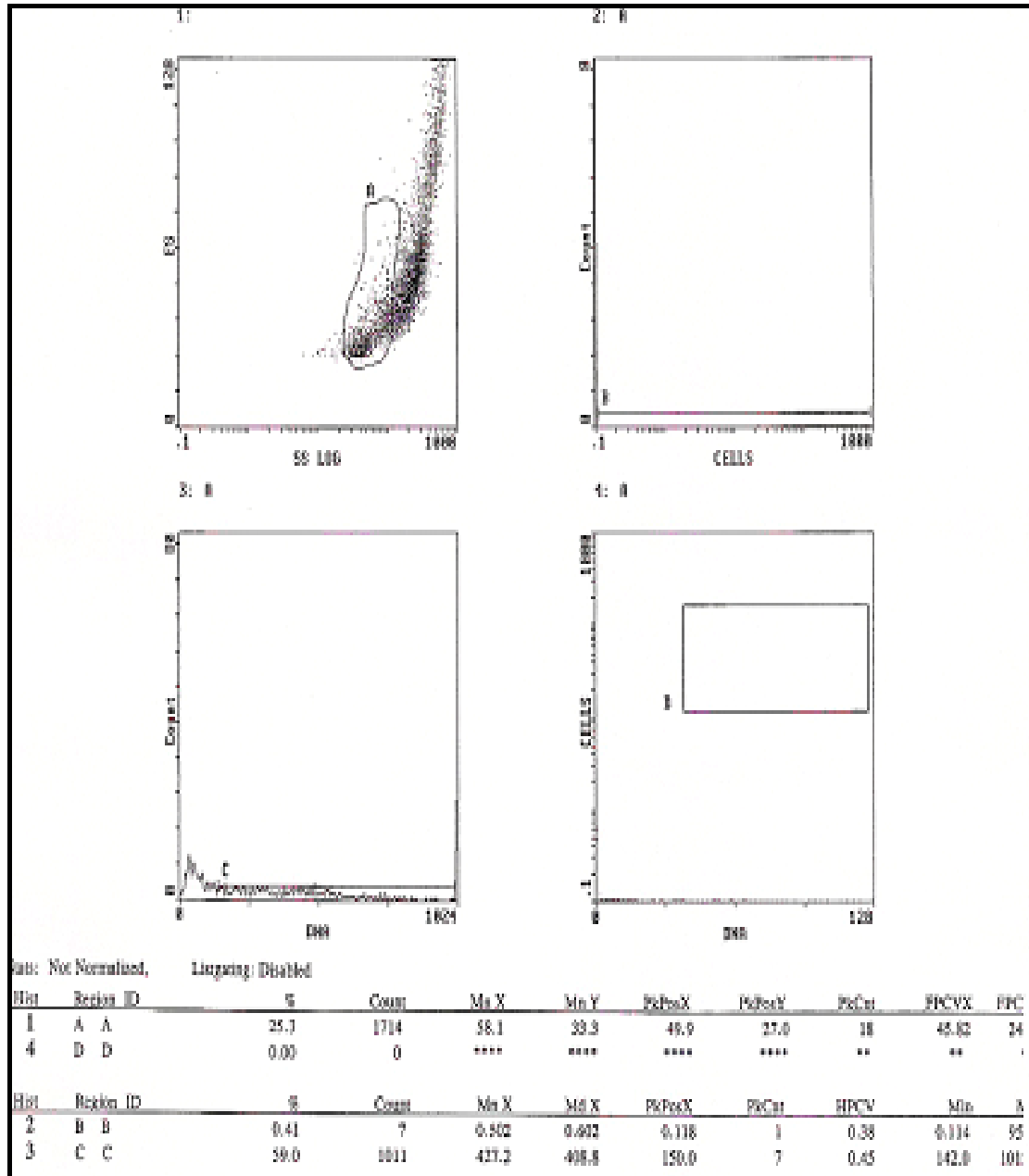
Διάγραμμα 54: Απεικόνιση της κυτταροτοξικότητας των φονικών λεμφοκυττάρων ενός εθελοντή μέσω του κυτταρομετρητή ροής, κατόπιν χορήγησης του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* + *Abies alba* στην αναλογία δραστικών κυττάρων προς τα κύτταρα στόχους 12,5 : 1 (η μικρότερη αναλογία).



Διάγραμμα 55: Απεικόνιση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων υγιούς εθελοντή μέσω του κυτταρομετρητή ροής, κατόπιν χορήγησης του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* + *Abies alba*, στην αναλογία δραστικών κυττάρων (effectors) προς τα κύτταρα – στόχους 25 : 1 (η μέση αναλογία)



Διάγραμμα 56: Απεικόνιση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων εθελοντή μέσω της χρήσης του κυτταρομετρητή ροής, κατόπιν χορήγησης του μικτού εκχυλίσματος των φυτών *Viscum album* και *Abies alba* σε εναιώρημα φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων και κυττάρων στόχων στην αναλογία δραστικών - κυττάρων στόχων 50 : 1 (η υψηλή αναλογία).



ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Abies alba* + *Viscum album*.

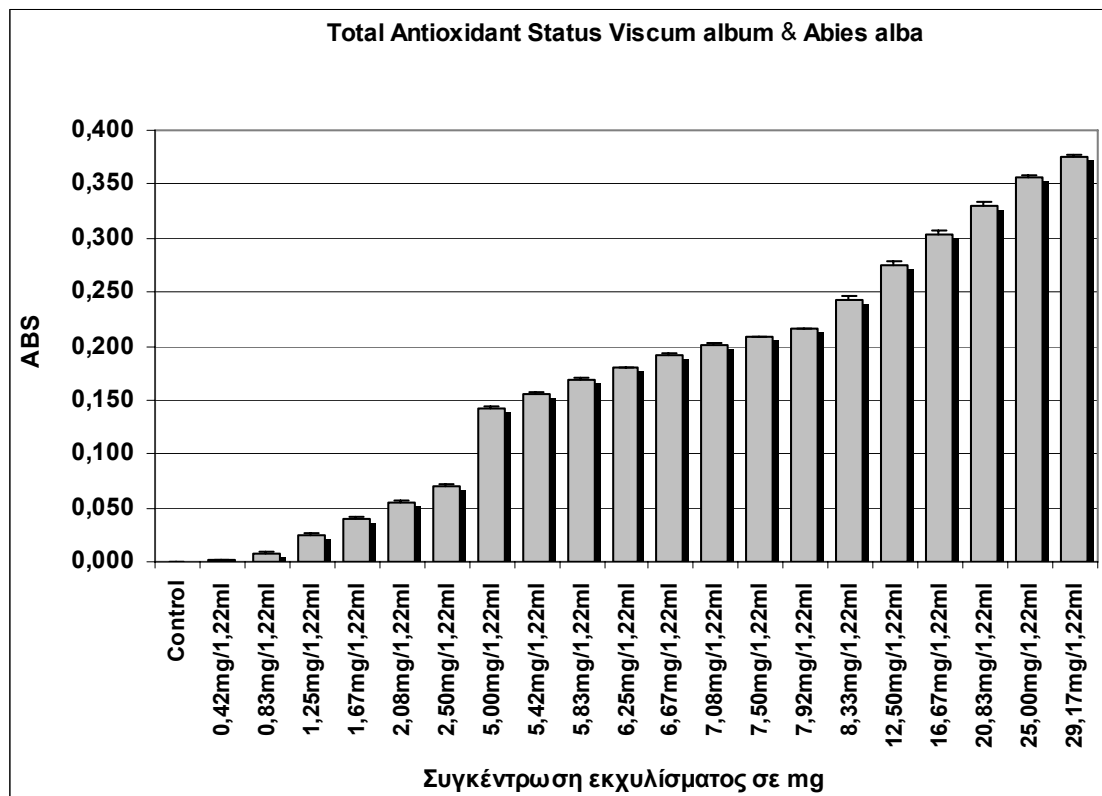
Το μικτό φυτικό εκχύλισμα των *Abies alba* + *Viscum album* δοκιμάστηκε ως προς την ολική του αντιοξειδωτική ισχύ με την έγκυρη φωτοφασματομετρική μέθοδο της εταιρείας Randox σε έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Κάθε δείγμα μελετήθηκε κατ' ελάχιστον τρεις φορές. Βάση των δεδομένων δημιουργήθηκε το ακόλουθο διάγραμμα 57 το οποίο συνοψίζει την μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ισχύος του εκχυλίσματος, συναρτήσει της ποσότητας αυτού.

Παρατηρούμε ότι η αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ισχύος εμφανίζει αρκετά καλή γραμμικότητα, όπως επίσης και μικρή ασυνέχεια, η οποία εκδηλώνεται σε δύο σημεία της κλιμάκωσης των συγκεντρώσεων:

1^ο) Στο σημείο της μετάβασης από την περιεκτικότητα 2,5 mg / 1,22 ml προς την περιεκτικότητα 5,0 mg / 1,22 ml.

Σημειωτέον ότι στο πρώτο σημείο αλλαγής της κλίσης της καμπύλης απορρόφησης έχουμε κατά προσέγγιση και την ελάχιστη θανατηφόρα δόση για τα λειομυοσαρκοματικά κύτταρα *in vitro*.

Διάγραμμα 57



ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το αντικείμενο της ανά χείρας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη μιας σειράς βιολογικών δράσεων των εκχυλισμάτων δύο συνεργούντων φυτών επί μιας σειράς πειραματικών μοντέλων του καρκίνου.

Δηλαδή στην εν λόγω διατριβή ελέγξαμε τις δράσεις των εκχυλισμάτων των δύο εν λόγω συνεργούντων φυτών επί πειραματικών μοντέλων τα οποία αντιπροσωπεύουν μια σειρά διαφορετικών ουσιαστικών όψεων του φαινομένου «Καρκίνος», προκειμένου να επιτύχουμε την προσπόριση γνώσης επί ενός αριθμού μηχανισμών μέσω των οποίων δρουν τα σύνολα των ουσιών που εμπεριέχονται στο καθένα από τα δύο αλληλεπιδρώντα φυτά ξεχωριστά, όσο και μαζί.

Συνεπώς ακολουθήθηκε τόσο ο αναγωγικός όσο και ο παραγωγικός τρόπος επιστημονικής σκέψης, ώστε να απαντήσουμε όχι μόνον σε αμιγώς ιατρικά ερωτήματα, αλλά και σε ερωτήματα που εκτείνονται πέραν του στενού ιατρικού πλαισίου, εισερχόμενοι στον βαθύτερο χώρο της Βιολογίας, που μελετά και αιτιολογεί την σοφία και την σκοπιμότητα των αλληλεπιδράσεων διαφορετικών οργανισμών – ζωικών και φυτικών – για να υπογραμμίσει στον Άνθρωπο την συνετή αξία της μέριμνας για όλα τα είδη που συνοδοιπορούν μαζί μας στο ταξίδι του Φαινομένου της Ζωής.

Δώσαμε μια αρχική έμφαση σε αυτή την διάσταση του ζητήματος, απλώς για να μην ξεχάσουμε το γεγονός ότι εδώ πρέπει να ξαναεπιστρέψουμε, εφ' όσον θα έχουμε διαδράμει την ανάλυση των πειραμάτων που εμπεριέχονται στην παρούσα διατριβή.

Ήδη πριν ξεκινήσουμε την εκπόνηση της ανά χείρας διατριβής, μελετούσαμε τις δράσεις του *Viscum album* σε επίμυες Wistar οι οποίοι είχαν καταστεί καρκινοπαθείς μέσω της έγχυσης B[a]P ακολουθώντας το μοντέλο χημικής καρκινογένεσης, που χρησιμοποιήσαμε κατόπιν για τα περισσότερα από τα μετέπειτα πειράματά μας.

Η πρώτη εφαρμογή ενός υδατικού εκχυλίσματος, αρχικά μόνον του *Viscum album*, έγινε με τροχιοδεικτικό σκοπό επί 20 επίμυων οι οποίοι αποτελούσαν και την ομάδα ελέγχου ενός πειράματος καρκινογένεσης που

είχε ήδη περατωθεί. Τα ζώα αυτά επρόκειτο να θανατωθούν εντός λίγων ωρών, οπότε αποφασίσαμε να τα αφήσουμε μερικές ημέρες ζωντανά και να τα τροφοδοτήσουμε με μεγάλες ποσότητες υδατικού εκχυλίσματος του φυτού, προκειμένου να δούμε αν θα υπάρξει κάποια μεταβολή στο προσδόκιμο επιβίωσης των ήδη βαρέως πασχόντων ζώων. Έτσι μοιράσαμε τα 20 καρκινοπαθή ζώα σε δύο ισάριθμες ομάδες των 10 ζώων η κάθε μία και στα μιν δέκα πρώτα χορηγούσαμε νερό του αγωγού, ενώ στα 10 δεύτερα χορηγούσαμε το υδατικό εκχύλισμα του *Viscum album*.

Δεδομένου ότι ήταν καλοκαίρι και η θερμοκρασία ήταν υψηλή, κρατούσαμε τα ζώα χωρίς νερό καθ' όλη την ημέρα και τους δίνουμε, στα μιν του Ελέγχου μόνο νερό, στα δε της Θεραπείας μόνον εκχύλισμα, οπότε η κατανάλωση εξ αυτών ήταν πολύ μεγάλη.

Οι όγκοι των ζώων της Ομάδος Θεραπείας από ιδιαιτέρως σκληροί και συμπαγείς άρχισαν να μετατρέπονται σε μαλακούς και ευπίεστους, χωρίς να σημειώνεται αύξησή τους, ενώ μέσα σε χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας οι μεταβολές ήσαν πλέον οφθαλμοφανείς: το δέρμα των ζώων που περιέβαλε τους όγκους κρεμόταν και έδινε την όψη ασκού που περιείχε υδαρές περιεχόμενο. Αντιθέτως οι όγκοι των ζώων της Ομάδας Ελέγχου συνέχιζαν να μεγαλώνουν και να παραμένουν σκληροί, χωρίς την παραμικρή ένδειξη ρευστοποίησης του περιεχομένου τους.

Τέσσερα από τα ζώα της ομάδας θεραπείας κατέληξαν εντός ενός δεκαημέρου από την έναρξη της χορήγησης του υδατικού εκχυλίσματος, ενώ το ίδιο χρονικό διάστημα μόνον ένα ζώο από την ομάδα ελέγχου κατέληξε. Το δεδομένο αυτό δεν μας άρεσε, αλλά το αρνητικό μας συναίσθημα αντιστράφηκε από τον νεκροτομικό έλεγχο. Η νεκροτομή των ζώων αυτών έδειξε ότι ο κακοήθης όγκος του ζώου της ομάδας ελέγχου ήταν συμπαγής και χωρίς στοιχεία μαζικής νέκρωσης ενώ ο θάνατος είχε επέλθει από πνευμονικό οίδημα.

Από την άλλη πλευρά και οι τέσσερις όγκοι των νεκρών ζώων της ομάδας θεραπείας ήσαν σαθροί και τετηγμένοι σε σημείο ολικής ρευστοποίησης του περιεχομένου τους, ενώ υπήρχαν σαφή στοιχεία γενικευμένης αιμορραγίας στο υπόλοιπο σώμα, η οποία είχε κατά τα φαινόμενα προκαλέσει και τον θάνατο. Έχοντας κατά νου την εικόνα αυτή, αρχίσαμε να παρακεντούμε τα υπόλοιπα ζώα της ομάδας θεραπείας τα οποία

με τον τρόπο αυτό επιβίωσαν επί ένα ικανό χρονικό διάστημα, πολύ μεγαλύτερο από το χρονικό διάστημα της επιβίωσης των ζώων της ομάδας ελέγχου.

Λάβαμε απ' όλα τα ζώα μας τεμάχια των όγκων, όπως επίσης όργανα και ιστούς και μετά την μονιμοποίησή τους παρασκευάσαμε μια σειρά εγκλείστων σε παραφίνη (block), από τα οποία λάβαμε λεπτές τομές που εγκλείσαμε σε αντικειμενοφόρους πλάκες μετά καλυπτρίδων.

Οι μικροσκοπήσεις μας έδειξαν ότι όλα τα παρασκευάσματα τα προερχόμενα από τους όγκους των ζώων θεραπείας περιείχαν πάρα πολλά κυτταρικά ράκη και σκόρπιους πληθυσμούς κυττάρων σε πορεία εκφυλισμού, ενώ τα παρασκευάσματα των όγκων της ομάδας ελέγχου έδειχναν εικόνες σαρκωμάτων αποτελούμενων από ατρακτοειδή κύτταρα, χαμηλής διαφοροποίησης, που βρισκόταν σε υψηλή μιτωτική δραστηριότητα και μειωμένα ποσοστά κυττάρων σε πορεία εκφυλισμού και θανάτου. Τα σπλάχνα και κυρίως τα αγγεία των ζώων της Ομάδας Θεραπείας εμφάνιζαν εξαγγειώσεις αίματος, δηλαδή την εικόνα διάχυτων αιμορραγικών φαινομένων, υποδεικνύοντας ως αιτία αυτών ένα σύνδρομο διάχυτης ενδαγγειακής πήξης, που λαμβάνει χώρα στην κυκλοφορική καταπληξία, ενώ τέτοια φαινόμενα δεν συναντήσαμε στα ζώα της Ομάδος Ελέγχου.

Η εικόνα αυτή και η υπάρχουσα βιβλιογραφία μας έκανε να επεξεργαστούμε την στρατηγική που περιγράψαμε στο αντίστοιχο κεφάλαιο των «Υλικών και Μεθόδων».

Ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας είχε σταδιακά ανατείλει μια θεωρητική θέση, σύμφωνα με την οποία διάφορες ουσίες, οι οποίες εμφάνιζαν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μπορούσαν ταυτοχρόνως να λειτουργήσουν ως αναστολείς της χημικής καρκινογένεσης, αλλά και ως αμιγείς αντικαρκινικοί παράγοντες. Η θέση αυτή βασιζόταν σε μια σειρά πειραμάτων που είχαν ξεκινήσει ήδη από τις αρχές του 1970 εκ μέρους των Δρ Γεωργίου Καλλίστρατου Δρ. Timmerman και Δρ Alexander Phau, οι οποίοι εργαζόταν επί του αντικείμενου της ανάπτυξης μιας καινούργιας τότε, μεθόδου για την πρόληψη διάγνωση των κακοηθών όγκων σε προκλινικό επίπεδο (405, 406).

Οι εν λόγω επιστήμονες έδειξαν ότι υπάρχουν πολλές φυσικές ουσίες οι οποίες ήσαν σε θέση να αδρανοποιήσουν ισχυρά καρκινογόνα με δομή

πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα, κατ' αρχάς πραγματοποιώντας αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς του καρκινογόνου (406, 407, 408, 409, 410).

Η εξέλιξη αυτού του ρεύματος μελέτης οδήγησε στην δοκιμή της αντικαρκινογόνου δράσης μιας σειράς αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως το ασκορβικό οξύ, η α – τοκοφερόλη και το β – καροτένιο, που απαντούν σε πληθώρα φυτικών οργανισμών, καθώς και του ιχνοστοιχείου σεληνίου. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριό μας την δεκαετία του 1980 έδειξαν ότι οι εν λόγω ουσίες ασκούσαν μια προληπτική δράση κατά της χημικής καρκινογένεσης (411, 412).

Ωστόσο η δράση ενός cocktail περιέχοντος ασκορβικό οξύ, α – τοκοφερόλη και β – καροτένιο έδειξε ότι το μίγμα των εν λόγω ουσιών ήταν σε θέση να οδηγήσει και στην εξαφάνιση κακοηθών όγκων, οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί ήδη μέσω χημικής καρκινογένεσης με B[a]P σε επίμυες Wistar και είχαν ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο μέγεθος, πέραν του οποίου δεν υπάρχει δυνατότητα αυτογενούς εξαφάνισης του όγκου (72, 73, 413).

Τα ερευνητικά αυτά αντικείμενα έδειξαν ότι υπήρχε ένα ενδιαφέρον έδαφος για μια νέα προσέγγιση πολλών φαινομένων του καρκίνου, η οποία μάλιστα είχε προταθεί περί τα 12 χρόνια πριν από τον Linus Pauling και τον Edwant Cameron, αλλά είχε ταυτοχρόνως αντιμετωπιστεί με μια καχυποψία από διάφορους ιατρικούς κύκλους (414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423).

Παράλληλα με τη γενική διατύπωση αυτών των διαπιστώσεων για τις δράσεις των αντιοξειδωτικών, λάμβανε χώρα μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιούνταν μέσα στο πλαίσιο ενός ερευνητικού προγράμματος σχετικού με την αναστολή της δράσης του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), αποτελώντας αντικείμενο μιας διδακτορικής διατριβής. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι συνολικά, το φαινόμενο της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μπορούσε να τροποποιηθεί από τους ίδιους παράγοντες οι οποίοι προκαλούσαν και αναστολή ή τροποποίηση της χημικής καρκινογένεσης (424).

Γενικά εκείνη την χρονική περίοδο υπήρχε μια εκρηκτική άνθηση της έρευνας πάνω στον τομέα των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού stress, η

οποία με ταχύ βηματισμό εγκαθιστούσε ένα καθεστώς ενοποίησης πολλών ετερογενών φυσιοπαθολογικών φαινομένων και καταστάσεων.

Αυτός ο ερευνητικός χώρος φαινόταν να ενοποιεί ετερογενή φαινόμενα, τόσο στο επίπεδο των φυσιολογικών όσο και σε εκείνο των παθολογικών διεργασιών και η εξέλιξη της συνολικής έρευνας επιβεβαίωσε κατόπιν αυτή την σύγκλιση των πραγμάτων (425, 426, 427, 428).

Μια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Φυσιολογίας, έδειξε ότι όλοι οι γνωστοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες, αλλά και άλλα μόρια – όπως οι παγιδευτές της ιδιοστροφορμής των ηλεκτρονίων (spin trappers) είχαν την ιδιότητα, να διεγείρουν την παραγωγή συγκεκριμένων κυτταροκινών εκ μέρους λεμφοκυττάρων καρκινοπαθών ανθρώπων σε καθεστώς καλλιέργειας, εκτός του ότι ανέστειλαν την χημική καρκινογένεση και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (429, 430).

Έτσι λοιπόν όταν ξεκινήσαμε την μελέτη των εκχυλισμάτων του *Viscum album* ήδη υπήρχε στην ερευνητική μνήμη του Εργαστηρίου μας ένα ικανό γνωσιολογικό υπόστρωμα, το οποίο μπορούσε να θέσει σε μια νέα βάση την μελέτη αυτού του φυτού, του οποίου τα εκχυλίσματα εμφάνιζαν αξιόλογες αντικαρκινικές ιδιότητες, οι οποίες δεν περιοριζόταν αποκλειστικά στις λεκτίνες και τις βισκοτοξίνες, που αποτελούν τα αποδεκτά διεθνώς αντικαρκινικά συστατικά του εν λόγω φυτού, αλλά εκτεινόταν σε ένα, κατά τα φαινόμενα, μεγάλο αριθμό ενώσεων μικρών μοριακών βαρών. Καθοριστικό ρόλο για την δόμηση της μελέτης μας αποτέλεσε το γεγονός ότι η αντικαρκινική κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων του *Viscum album* σχετιζόταν εμφανώς με τον ξενιστή του φυτού, οπότε στην όλη προβληματική έπρεπε να εισέλθει και η μελέτη του ξενιστή, έτσι ώστε να αιτιολογηθούν οι μεταβολές της κυτταροτοξικότητας του επιφύτου που προέκυπταν από τα διαφορετικά είδη των ξενιστών (377, 431, 432).

Το σύνολο των δεδομένων αυτών λειτούργησε έτσι ώστε να τεθούν μια σειρά κρίσιμων ερωτημάτων ευθύς εξ αρχής για την διεξαγωγή της εν λόγω μελέτης. Τα ερωτήματα αυτά ήσαν τα εξής:

- 1^{ον}) Έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες τα δύο συνεργούντα φυτά *Viscum album* - *Abies alba*;
- 2^{ον}) Έχουν αντικαρκινογόνες ιδιότητες;
- 3^{ον}) Είναι σε θέση να επηρεάσουν την ανοσολογική απάντηση ενός οργανισμού;
- 4^{ον}) Είναι σε θέση να επηρεάσουν την μεταστατική διασπορά και μέσω ποιου μηχανισμού;
- 5^{ον}) Διαθέτουν κάποιο θεμελιώδες χημικό χαρακτηριστικό το οποίο να δικαιολογεί κατά βάση τις όποιες βιολογικές τους δράσεις κατά του καρκίνου;
- 6^{ον}) Τροποποιούν κάποιον θεμελιώδη μεταβολισμό ο οποίος ευθύνεται για μια πλειάδα φαινομένων συνδεδεμένων στενά στο πλαίσιο της οντότητας του καρκινικού κυττάρου και του οργανισμού που αποτελεί τον φορέα και ξενιστή του;
- 7^{ον}) Ποια μέρη των δύο φυτών περιέχουν τα βιολογικώς δραστικά συστατικά;

Η μελέτη την οποία πραγματοποιήσαμε φαίνεται ότι δίνει αξιόπιστες απαντήσεις στα ερωτήματα αυτά, αν και υπάρχει ακόμη πολύ έδαφος προς αναγνώριση. Ας δούμε όμως ένα προς ένα τα ερωτήματα που ετέθησαν και τις απαντήσεις που εδόθησαν.

Κατ' αρχήν όλα τα εκχυλίσματα που παρασκευάσαμε από τους ιστούς και των δύο φυτών και συγκριμένα για το μεν *Viscum album* τα εκχυλίσματα των φύλλων, των βλαστών και των καρπών, για το δε *Abies alba* τα εκχυλίσματα των φύλλων, του φλοιού και του ξύλου, είναι σε θέση να επιφέρουν τον θάνατο στα καρκινικά κύτταρα *in vitro*, αλλά και να μειώσουν τους κακοήθεις όγκους *in vivo*, μέχρις πλήρους εξαφάνισης.

Δεδομένου ότι το ζώο αποτελεί ένα πολύπλοκο μοντέλο καρκίνου, όπου οι δράσεις ενός φαρμάκου μπορεί να μην είναι αποκλειστικά ευθείες, αλλά μπορεί να προκύπτουν από ενίσχυση διαφόρων μηχανισμών, όπως π.χ του ανοσοποιητικού συστήματος, το καλύτερο μοντέλο για να καθορίσει κανείς αν υπάρχει αμιγής αντικαρκινική δράση εκ μέρους ενός φαρμάκου

(αποτελούμενου από μια ή περισσότερες ουσίες) είναι οι καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων.

Τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμοσ Wistar (που αναφέρονται και ως ατρακτοειδή κύτταρα) είναι πολύ ανθεκτικά σε άλλα τυπικά αντικαρκινικά φάρμακα, όπως π.χ το cis – platinum. Σε διάφορες σειρές πειραμάτων που έγιναν κατά καιρούς στο Εργαστήριό μας, προκειμένου να διαπιστώσουμε την αντοχή των εν λόγω κυττάρων, το cis – platinum τιθέμενο στην ελάχιστη θανατηφόρο δόση (20 μ M) φόνευσε στις 24 ώρες το 98 % του κυτταρικού πληθυσμού, αφήνοντας ένα υπόλειμμα 2 %, το οποίο κατόπιν έδειξε μια βραδεία ικανότητα σχηματισμού αποικιών.

Την ίδια κυτταροτοξική δράση εμφάνισαν και τα 5 – 7,5 mg εκχυλίσματος φύλλων *Viscum album* τοποθετημένα στα τρυβλία των 3 ml. Ανάλογα δεδομένα έδειξαν και τα εκχυλίσματα των φύλλων του *Abies alba*, επίσης στις συγκεντρώσεις των 5 – 7,5 mg ανά τρυβλίο των 3 ml, δηλαδή 1,7 – 2,5 mg / ml θεραπευτικού μέσου των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμοσ. Ωστόσο μια επανάληψη των πειραμάτων με τα εκχυλίσματα του *Abies alba*, δηλαδή του ξενιστή, έδειξε ότι αυτά ήσαν ισχυρότερα από τα αντίστοιχα του *Viscum*, διαθέτοντας σχεδόν διπλάσια κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα του επίφυτου. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών των εναπομεινάντων νεοπλασματικών κυττάρων εμφάνισε επίσης μια ανάλογη πορεία με αυτών που δέχτηκαν την δράση του cis – platinum και ίσχυε για τα δύο φυτικά εκχυλίσματα.

Αν θεωρούσαμε ότι η κυτταροτοξικότητα του εκχυλίσματος των δύο φυτών οφειλόταν σε όλες τις ουσίες αυτού, τότε το εκχύλισμα του ενός και του άλλου φυτού θα ήταν τουλάχιστον 250 φορές λιγότερο τοξικό ως προς το cis – platinum. Βεβαίως αυτό δεν συμβαίνει στην πραγματικότητα διότι σχεδόν ποτέ το καθαρό βάρος ενός εκχυλίσματος δεν ισούται με το βάρος των δραστικών συστατικών αυτού, αλλά είναι προφανώς μικρότερο, αν θεωρήσουμε ότι τα δραστικά συστατικά περιορίζονται σε λίγα είδη μορίων. Προφανώς το επόμενο βήμα της έρευνας μετά το πέρας αυτής της διατριβής είναι πλέον η αναζήτηση των ενεργών συστατικών.

Περνώντας στο in vivo μοντέλο διαπιστώνουμε ότι έχουμε πλήρη καταστροφή των κακοηθών όγκων στην δόση των 450 – 560 mg / kg b.w, πράγμα που δηλώνει ότι δεν είναι μόνο η αμιγής κυτταροτοξικότητα η οποία

προκαλεί τον θάνατο του κακοήθους μορφώματος, αλλά φαίνεται σαφώς ότι συνεισφέρουν και άλλοι μηχανισμοί, οι οποίοι διεγείρονται από τα συστατικά του εκχυλίσματος των δύο φυτών.

Αν η αποσάθρωση των όγκων οφειλόταν αποκλειστικά στην αμιγή κυτταροτοξικότητα του εκχυλίσματος (από εδώ και στο εξής μιλάμε πλέον για το μικτό τετραμερές εκχύλισμα των δύο φυτών), προβάλλοντας τα δεδομένα της κυτταροκαλλιέργειας στο σωματικό μέγεθος του επίμουσ Wistar, η ποσότητα της δόσης που θα προκαλούσε θάνατο στα κύτταρα του κακοήθους όγκου θα ήταν κατά προσέγγιση ίση προς 1600 mg / kg b.w. Το δεδομένο αυτό εμφανίζεται σε δύο σειρές πειραμάτων, μια στην οποία οι όγκοι προήλθαν από ενοφθαλμισμό νεοπλασματικών κυττάρων και μια δεύτερη στην οποία οι όγκοι προέκυψαν από έγχυση B[a]P, υποδεικνύοντας τον συμψηφισμό τόσο ενός μηχανισμού όπως η άμεση κυτταροτοξικότητα, όσο και ενός δεύτερου μηχανισμού κυτταροτοξικότητας, που ενδεχομένως αντιπροσωπεύεται από την στοχευμένη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά του όγκου (69, 433).

Δεδομένου ότι υπάρχει σημαντική βιβλιογραφική τεκμηρίωση ότι στον καρκίνο η λειτουργία των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων εμφανίζει κάποια κάμψη, αποφασίσαμε να ελέγξουμε τις δράσεις του μικτού εκχυλίσματος επί της κυτταροτοξικής ικανότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων (NKCs) του ανθρώπου.

Ο έλεγχος του ανοσοποιητικού συστήματος στον επίμου Wistar είναι αρκετά δύσκολος, εξ αιτίας του γεγονότος ότι περιέχει μικρές ποσότητες αίματος και υπάρχουν κάποιες τεχνικές δυσκολίες στην απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων λεμφοκυττάρων αυτού, όπως επίσης και στον διαχωρισμό τους σε υποομάδες.

Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλά προβλήματα τυποποίησης των τεχνικών των σχετικών με τις λειτουργικές αντιδράσεις των NK – λεμφοκυττάρων του επίμου Wistar, χρησιμοποιήσαμε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα NK, τα οποία λαμβάναμε σε μεγάλες ποσότητες από 12 υγιείς εθελοντές, μη καπνιστές, που δεν κατανάλισκαν φαρμακευτικές ουσίες και οινοπνευματώδη ποτά, καθ' όλη την περίοδο που εξελισσόταν το πρόγραμμα των πειραμάτων. Τα εν λόγω άτομα παρέμειναν σε ένα ποικίλο, αλλά ήπιο

διαιτολογικό καθεστώς το οποίο περιλάμβανε τρία ημερήσια γεύματα ανά οκτώωρο. Οι αιμοληψίες γινόταν σε τακτικά χρονικά διαστήματα και τα λεμφοκύτταρα των εθελοντών επωαζόταν επί ένα δίωρο με μια συγκεκριμένη ποσότητα του cocktail των εκχυλισμάτων των δύο φυτών.

Οι χρησιμοποιηθείσες ποσότητες του εκχυλίσματος ήσαν λίγα μl και επιλέχτηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να μην είναι τοξικές για τα κύτταρα στόχους, όπως επίσης δεν ήσαν τοξικές για τα λεμφοκύτταρα NK.

Τα δεδομένα από το εν λόγω πείραμα ήσαν πολύ ενδιαφέροντα καθόσον σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε μια υψηλή αύξηση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων, εναντίον των καρκινικών κυττάρων τόσο της σειράς K – 562, του ανθρώπου, όσο και της σειράς των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμυος Wistar, ως στόχων.

Και στις δύο περιπτώσεις των νεοπλασματικών κυττάρων παρατηρήσαμε ότι η συμπεριφορά των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων ήταν ανάλογη, εμφανίζοντας τα ίδια ποσοστά κυτταροτοξικότητας, παρά το γεγονός ότι στην προκειμένη περίπτωση είχαμε δύο διαφορετικά είδη καρκινικών κυττάρων, εκ των οποίων το ένα δεν προερχόταν από τον άνθρωπο, αλλά από ένα άλλο είδος – εν προκειμένου τον επίμυ Wistar. Δηλαδή αν και οι γενετικές αποστάσεις ήσαν διαφορετικές, οπότε θα περίμενε κανείς μια υψηλότερη κυτταροτοξική δραστηριότητα των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων NK ενάντια στην σαρκωματική κυτταρική σειρά του επίμυος, εν τούτοις η ανταπόκριση των φυσικών φονέων υπήρξε ισότιμη.

Το φαινόμενο αυτό φαίνεται πολύ ενδιαφέρον διότι, όπως γνωρίζουμε, τα λεμφοκύτταρα NK εμφανίζουν μια συνολική επιθετικότητα ενάντια σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου, αλλά και εν γένει μικροοργανισμού, που δεν έχει τα πρωτεϊνικά χαρακτηριστικά του «Εαυτού», πράγμα που δείχνει ότι επιτελούν μια αδιαφοροποίητη εκκαθαριστική λειτουργία εκ μέρους του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συνεπώς μπορούμε να πούμε – κατ' αρχήν – ότι το εκχύλισμα (ή τα ειδικά μόρια που περιέχει) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ισχυρό ενισχυτικό μέσον του ανοσοποιητικού συστήματος, τουλάχιστον όσον αφορά την συνιστώσα των λεμφοκυττάρων NK. Το κατά πόσον η αύξηση της κυτταροτοξικότητας των εν λόγω φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων στρέφεται μόνον στα καρκινικά κύτταρα ή είναι κάτι που λαμβάνει χώρα για την

γενικότερη αντιμετώπιση των ξένων ως προς τον οργανισμό κυττάρων, απαιτεί την πραγματοποίηση μεγάλης ακόμη ερευνητικής προσπάθειας, αλλά γενικά η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι οι φυσικοί φονείς στρέφονται κατά πολλών ειδών στόχων, μέσα στους οποίους εμπεριέχονται και τα καρκινικά κύτταρα (434, 435, 436, 437, 438).

Αν ο συνδυασμός των εν λόγω εκχυλισμάτων, και συνεπώς τα μόρια που εμπεριέχει, περιλαμβάνουν κάποιους παράγοντες που ενισχύουν την δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων NK *εξειδικευμένα* εναντίον των καρκινικών κυττάρων, αυτό θα αποτελούσε μια ανακάλυψη ιδιαίτερου βάρους, καθόσον θα διαπιστωνόταν ότι ο οργανισμός διαθέτει κάποια *εντελώς εξειδικευμένη ομοιοστασία απέναντι στην ανάπτυξη των κακοηθών όγκων*, πράγμα που φαίνεται ότι υφίσταται, χωρίς ωστόσο να εντοπιστεί και επιβεβαιωθεί.

Αν θεωρήσουμε ότι η Φυσική Επιλογή έχει δημιουργήσει λεπτοφυέστατους μηχανισμούς προκειμένου να εξειδικεύσει την ομοιοστασία των έμβιων όντων, δεν είναι καθόλου απίθανο να υπάρχει μια τέτοιου είδους εξειδίκευση κάποιων συνιστωσών του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον της ανάπτυξης των κακοηθών όγκων. Αν αυτός ο υποτιθέμενος μηχανισμός παραβλαφτεί και χάσει την αποτελεσματικότητα και την ευστοχία του, τότε η ανάπτυξη ενός νεοπλασματος είναι πάντοτε ζήτημα χρόνου.

Σε ένα ιστορικής σημασίας συνέδριο για τον ρόλο των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών στην ανθρώπινη φυσιολογία, το οποίο διεξήχθη το 1984 στο Davis (Davis Conference 397, 398) ετέθη το ζήτημα της ύπαρξης και της ευστάθειας ενός τέτοιου εξειδικευμένου μηχανισμού, μέσα στο πλαίσιο της γενικότερης συζήτησης. Στο συνέδριο αυτό επιχειρήθηκε να γίνει μια αντικειμενική συνάρθρωση των διαφόρων μηχανισμών που υπάρχουν στην βάση των μεγάλων παθολογιών που αφορούν το ανθρώπινο είδος και φαίνεται ότι το εγχείρημα υπήρξε επιτυχές (399, 400).

Σε ένα άρθρο σχετικό με το συνέδριο του Davis, ο Halliwell υπογραμμίζει ότι η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου τόσο στον επίμυ, όσο και στον άνθρωπο ακολουθούν μια εκθετική πορεία συναρτήσεως της ηλικίας, πράγμα που υπονοεί ότι οι μηχανισμοί σταθεροποίησης και ιστολογικής διαφοροποίησης των κυτταρικών πληθυσμών, που απαρτίζουν τον

οργανισμό, χάνουν βαθμηδόν και κατόπιν με πολύ μεγάλη ταχύτητα την ευστοχία τους, για να επέλθει αναγκαστικά ο θάνατος του ατόμου (439, 440, 441, 442).

Εδώ πρέπει να συμβαίνουν δύο τινά: ή ο μηχανισμός που καθαρίζει το σώμα από τα καρκινικά κύτταρα αστοχεί όλο και περισσότερο, συναρτήσσει του χρόνου, ή ο ρυθμός των μεταλλάξεων γίνεται πλέον τόσο υψηλός ώστε δεν είναι σε θέση να τον παρακολουθήσει, πράγμα που υπονοεί έναν κορεσμό του εν λόγω μηχανισμού φόνευσης των καρκινικών κυττάρων ή ακόμη μπορεί να ισχύουν και τα δύο. Φυσικά οι ίδιες οι μεταλλάξεις που γενικότερα θίγουν την ευστάθεια κάθε είδους κυττάρου, θίγουν επίσης και την καλή λειτουργία των ιστών που αποτελούν την αντικαρκινική άμυνα του οργανισμού.

Μια σειρά άρθρων προερχομένων από την Γαλλική σχετική βιβλιογραφία δείχνουν ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος χάνουν μεγάλο μέρος της λειτουργικότητάς τους από καρκινογόνους και εν γένει μεταλλαξιγόνους παράγοντες, πράγμα που αποτελεί μια αναγκαία συνθήκη για να προκύψει κατόπιν η ανάπτυξη του κακοήθους όγκου (404). Αυτό σημαίνει, π.χ, ότι δεν αρκεί να προκαλέσει το 3,4 – βενζοπυρένιο κακοήθεις εξαλλαγές σε ένα αρκετά μεγάλο αριθμό φυσιολογικών κυττάρων του σώματος, αλλά ταυτόχρονα πρέπει να έχουμε και μια κάμψη του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού για να μπορέσει να αναπτυχθεί σε μακροσκοπικό επίπεδο ο κακοήθης όγκος (443, 444, 445).

Το δεδομένο αυτό φαίνεται ανάγλυφα από την διαφορά των δράσεων του μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών σε πειραματόζωα στα οποία αναπτύξαμε όγκο μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων και σε άλλα πειραματόζωα στα οποία ο όγκος αναπτύχθηκε μέσω χημικής καρκινογένεσης από 3,4 – βενζοπυρένιο.

Συγκεκριμένα, στα ζώα, στα οποία οι όγκοι αναπτύχθηκαν μέσω της έγχυσης του βενζοπυρενίου, η θεραπεία με ενέσεις εκχυλίσματος *Viscum album* + *Abies alba* είχε δράσεις ηπιότερες επί του κακοήθους όγκου, σε σύγκριση με τις δράσεις που καταγράψαμε στους όγκους οι οποίοι αναπτύχθηκαν επί υγιών ζώων μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων.

Η εν λόγω διαφοροποίηση του αντικαρκινικού αποτελέσματος στα δύο αυτά διαφορετικά μοντέλα καρκίνου δεν ήταν εύκολο να ερμηνευτεί, καθόσον

οι όγκοι των ζώων είχαν το ίδιο προσεγγιστικά μέγεθος και τα εκχυλίσματα που εδόθησαν και στις δύο ομάδες ζώων προερχόταν από την ίδια συλλογή φυτικών ιστών, οπότε δεν μπορούσαμε να αποδώσουμε την θεραπευτική διαφορετικότητα σε λόγους φαρμακολογικούς, σχετιζόμενους με διαφορετικά και ετερογενή μοριακά περιεχόμενα.

Συνεπώς υπάρχει μια βαθιά διαφορά μεταξύ των ζώων που έλαβαν το B[a]P και εκείνων που απλώς ενοφθαλμίστηκαν με 2×10^6 λειομυοσαρκωματικά κύτταρα: τα ζώα που υπέστησαν την δράση του B[a]P είναι πολύ πιο κοντά στην συνθήκη της πραγματικής χημικής καρκινογένεσης που εμφανίζεται στην καθημερινή πραγματικότητα, σε σύγκριση με εκείνα τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με τα νεοπλασματικά κύτταρα του λειομυοσαρκώματος.

Στην πραγματικότητα η ποσότητα του B[a]P που χορηγήθηκε σε κάθε πειραματόζωο ήταν πάρα πολύ μεγάλη, ως προς το βάρος του σώματος των αντίστοιχων ζώων, με αποτέλεσμα οι τοξικές δράσεις του εν λόγω χημικού παράγοντα να μην μπορεί να θεωρηθούν αποκλειστικά εστιασμένες, αλλά και συστημικές. Για να κατανοήσουμε το μέγεθος της ποσότητας του B[a]P αν ένας άνθρωπος 75 kg λάμβανε εκείνη την ποσότητα καρκινογόνου που αντιστοιχεί στο βάρος του, αυτή θα ισούταν με 3 gr καρκινογόνου.

Δεδομένου ότι το B[a]P αποτελεί ένα πλήρες καρκινογόνο, η διαδικασία της έναρξης και της προαγωγής είναι ενιαίες και αδιαχώριστες, ενώ η επόμενη φάση της αύξησης του όγκου ακολουθεί σε κάποια χρονική απόσταση.

Η ένεση του B[a]P στους επίμυες Wistar συνοδεύεται από μια αύξηση των απεκκρινόμενων ποσοτήτων μηλονικής διαλδεΐδης (και άλλων αλδεϋδών γνωστών με την γενική ονομασία «Ουσίες Αντιδρώσες με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ ή TBARS).

Η αύξηση των απεκκρινόμενων ποσοτήτων των εν λόγω TBARS μπορεί να υπερβεί για αξιόλογο χρονικό διάστημα ($\approx 17 - 25$ ημέρες), κατά δέκα και περισσότερες φορές την ποσότητα της μηλονικής διαλδεΐδης και των υπολοίπων TBARS που παράγονται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι τεράστιες ποσότητες TBARS που παράγονται από τον μεταβολισμό 10 mg B[a]P, όπως επίσης και η μεγάλη ενεργοποίηση των μηχανισμών απέκκρισης ούρων (των οποίων η καθημερινή ποσότητα

υπερδεκαπλασιάζεται) δείχνουν ότι η τοξίκωση από το βενζοπυρένιο έχει μεγαλύτερη διάσταση και δεν είναι ένα εστιασμένο φαινόμενο(72).

Συνεπώς είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι μέσα στις δράσεις του βενζοπυρενίου εμπεριέχονται και εκείνες οι οποίες αφορούν την κάμψη του ανοσοποιητικού συστήματος. Επειδή η μηλονική διαλδεΰδη και γενικότερα τα TBARS έχουν δράσεις γονιδιοτοξικές, είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι οι διάφορες σειρές λεμφοκυττάρων – συμπεριλαμβανομένων και των λεμφοκυττάρων NK – υφίστανται βλάβες, οι οποίες μειώνουν την κυτταροτοξική τους ικανότητα εναντίον των καρκινικών κυττάρων ως στόχων (446, 447, 448).

Φαίνεται ότι οι κακοήθεις εξαλλαγές που έγιναν σε τοπικό επίπεδο από το B[a]P δημιουργούν έναν *in situ* κακοήθη πληθυσμό, ο οποίος απαιτεί έναν χρόνο περί τις 100 ημέρες για να πολλαπλασιαστεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε να δώσει γένεση σε ένα νεόπλασμα μακροσκοπικών διαστάσεων. Είναι πιθανόν ότι κατά την διάρκεια του χρόνου αυτού τα τοπικά λεμφοκύτταρα NK επιχειρούν να εκκαθαρίσουν τα καρκινικά κύτταρα και ίσως κατορθώνουν να επιτύχουν μια ισορροπία, έτσι ώστε ο όγκος να περιορίζεται σε λίγες χιλιάδες κακοηθών κυττάρων αρχικά.

Κάποια στιγμή η δυναμική αυτή ισορροπία σπάζει υπέρ του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων, τα οποία σχηματίζουν πλέον τον ορατό μακροσκοπικά κακοήθη όγκο. Στο σημείο αυτό η παρέμβαση με την χορήγηση του cocktail των εκχυλισμάτων των δύο φυτών επιφέρει μεν μια αναστολή στην αύξηση του όγκου, ενδεχομένως λόγω και της κυτταροτοξικότητας των ουσιών που περιέχει, αλλά από την άλλη πλευρά δεν είναι σε θέση να διεγείρει ισχυρά το ανοσοποιητικό σύστημα και κυρίως τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα, ώστε να προκύψει μια μαζική νέκρωση του όγκου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι οι βλάβες, που ο μεταβολισμός του B[a]P έχει δημιουργήσει στα λεμφοκύτταρα NK και σε άλλες κυτταρικές σειρές του ανοσοποιητικού συστήματος, εξακολουθούν να υφίστανται.

Συνεπώς η εγκατάσταση της νεοπλασματικής νόσου δεν απαιτεί μόνον την κακοήθη εξαλλαγή μιας σειράς φυσιολογικών κυττάρων από έναν καρκινογόνο παράγοντα, όπως το B[a]P, αλλά και μια μόνιμη ή μακροχρόνια εξασθένηση του ανοσολογικού συστήματος.

Εξ αιτίας αυτής της ανοσολογικής εξασθένησης δεν έχουμε την μαζική και θεαματική νέκρωση των όγκων, στα ζώα που κατέστησαν καρκινοπαθή μέσω του Β[α]Ρ. Στο άλλο μοντέλο ανάπτυξης καρκίνου που βασίζεται στον ενοφθαλμισμό μεγάλων αριθμών καρκινικών κυττάρων, η τοξίκωση του οργανισμού των ζώων από το Β[α]Ρ λείπει, οπότε το ανοσοποιητικό σύστημα παραμένει ισχυρό και είναι σε θέση να ενεργοποιηθεί έντονα από την θεραπεία με το cocktail των φυτικών εκχυλισμάτων. Για τον λόγο αυτό παρατηρούμε εκείνες τις εντυπωσιακές νεκρώσεις όγκων, που αφορούν όλη την έκταση του κακοήθους όγκου και δεν εστιάζονται μόνον σε μερικά σημεία αυτού.

Όμως παρά αυτές τις διαφορές των μεγεθών της βλάβης που το κοκτέιλ των εκχυλισμάτων προκαλεί στους όγκους του Β[α]Ρ και στους όγκους του ενοφθαλμισμού, είναι πολύ σημαντικό να υπογραμμίσουμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις και στα δύο μοντέλα καρκίνου, οι νεκρώσεις των όγκων είναι εκτεταμένες: τεράστιες μεν στους όγκους του ενοφθαλμισμού, μικρότερες δε αλλά σημαντικού μεγέθους στους όγκους από βενζοπυρένιο!

Αυτή η διαπίστωση δεν περιορίζεται μόνον στις δράσεις των αιθανολικών εκχυλισμάτων, τα οποία παρήχθησαν υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας, με ταυτόχρονη πολύ περιορισμένη έκθεση στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο και στο φως, οπότε αναγκαστικά πολλά από τα ευαίσθητα μόρια παρέμειναν ενεργά, αλλά επεκτείνεται και στις δράσεις των υδατικών εκχυλισμάτων, τα οποία παρήχθησαν στην ελεύθερη ατμόσφαιρα και κατόπιν θερμικής επεξεργασίας διάρκειας μιας ώρας στους 95 °C, δηλαδή υπό συνθήκες αξιόλογης χημικής καταπόνησης.

Παρά το γεγονός ότι οι δράσεις των εκχυλισμάτων αυτών ήταν μικρότερες, εν τούτους το μέγεθός τους δεν ήταν περιορισμένο, ούτε φευγαλέο, αλλά διήρκησε μέσα στον χρόνο και επέφερε σημαντικές μεγεθύνσεις στο προσδόκιμο επιβίωσης των πειραματόζων. Εξ άλλου οι αντικαρκινικές δράσεις του θερμικά επεξεργασμένου υδατικού εκχυλίσματος που εν συνεχεία υπέστη λειοφυλίωση προκειμένου να χρησιμοποιηθεί, ήσαν αξιόλογες τόσο στο επίπεδο των *in vitro* πειραμάτων καρκινικών κυττάρων (σειρά L – 210), όσο και στο επίπεδο του *in vivo* πειράματος.

Ένα επίσης αξιόλογο φαινόμενο που αναδείχτηκε από τα πειράματα επί των δράσεων του μικτού εκχύλισματος με τα φυσικά φονικά λεμφοκύτταρα των εθελοντών, ήταν η διαπίστωση μιας ισορροπίας μεταξύ του συνολικού κυτταροτοξικού αποτελέσματος εναντίον των καρκινικών κυττάρων – στόχων και της αναλογίας του πληθυσμού λεμφοκυττάρων NK και καρκινικών κυττάρων.

Αυτό που διαπιστώσαμε σε όλες τις περιπτώσεις των δοκιμών μας ήταν ότι οι μεγαλύτερες αυξήσεις της λεμφοκυτταρικής φονικής δραστηριότητας λάμβαναν χώρο όταν ο αριθμός των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιούνται εναντίον ενός σταθερού αριθμού καρκινικών κυττάρων ήταν ο μικρότερος από τους τρεις που επελέγησαν.

Δηλαδή όταν είχαμε τον λόγο 12,5 : 1 φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων, τότε ο μέσος όρος αύξησης της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων NK από το μικτό εκχύλισμα ήταν ίσος προς $340 \pm 12 \%$, Αντιστοίχως στις αναλογίες 25 : 1 και 50 : 1 ο μέσος όρος της αύξησης της κυτταροτοξικότητας έπεφτε στο $165 \pm 25 \%$ και $73,5 \pm 16\%$ αντιστοίχως ($p < 0.05$).

Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει ένας τρόπος ανταπόκρισης των λεμφοκυττάρων NK που βασίζεται σε μια «αίσθηση» του πληθυσμού τους, έτσι ώστε αυτά να αυξάνουν υψηλά την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα όταν είναι λιγότερα, ενώ, όταν οι σχετικοί τους αριθμοί αυξάνονται, να την μειώνουν, διατηρώντας μια συνιστάμενη συνολική κυτταροτοξικότητα ενός ορισμένου μεγέθους. Αν δηλαδή υποθέταμε ότι η συνολική κυτταροτοξικότητα ενός συγκεκριμένου αριθμού λεμφοκυττάρων NK εναντίον ενός σταθερού πληθυσμού καρκινικών κυττάρων στόχων παριστάνονταν από την εξίσωση $KT(x) = n \cdot f(n)$, όπου $KT(x)$ η συνολική κυτταροτοξική ισχύς ενός πληθυσμού x λεμφοκυττάρων NK, n ο απόλυτος αριθμός αυτών και $f(n)$ η κυτταροτοξικότητα ενός εκάστου των εν λόγω λεμφοκυττάρων, είναι φανερό ότι η συνολική κυτταροτοξικότητα $KT(x)$ του συγκεκριμένου λεμφοκυτταρικού πληθυσμού θα ήταν ίση προς το γινόμενο $n \cdot f(n)$, στο βαθμό που οι επί μέρους κυτταροτοξικότητες αυτών είναι ίσες. Αν ήσαν διαφορετικές τότε η συνολική κυτταροτοξικότητα $KT(x)$ θα ήταν ίση προς το άθροισμα των επί μέρους μοναδιαίων κυτταροτοξικοτήτων και ο τύπος θα διαφοροποιούταν ως εξής:

$$KT(x) = k_1 + k_2 + k_3 + \dots + k_n = \sum (k_1 - k_n) \cdot / k_1, k_2, \dots, k_n$$

οι αντίστοιχες κυτταροτοξικότητες των επί μέρους λεμφοκυττάρων NK που απαρτίζουν τον υπό έλεγχο λεμφοκυτταρικό πληθυσμό.

Αν θεωρήσουμε ότι η συνολική κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων είναι ένα ομοιοστατούμενο μέγεθος που υποχρεωτικά πρέπει να κινηθεί μέσα σε ένα συγκεκριμένο διάστημα τιμών με ανώτερο και κατώτερο άκρο, τότε η σχετική αύξηση κυτταροτοξικότητας που προκαλεί το cocktail των δύο φυτών είναι συνάρτηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων NK, όταν οι κυτταροτοξικότητες του καθενός εξ αυτών είναι ισότιμες και φυσιολογικές. Η συνθήκη αυτή έχει κάποια σημασία για τον χειρισμό των ανοσολογικών αντιστάσεων ενός ατόμου εναντίον του καρκίνου (ενδεχομένως και των λοιμώξεων) και υποδεικνύει ότι οι φυσικοί φονείς επικοινωνούν μεταξύ τους και αλληλορυθμίζουν τις κυτταροτοξικές τους δράσεις, προκειμένου να πετύχουν ένα «οικονομικό» συνολικό φονικό αποτέλεσμα.

Με τα υπάρχοντα δεδομένα δεν είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε τον τύπο των μορίων τα οποία προκαλούν την αύξηση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων εναντίον των καρκινικών κυττάρων – στόχων. Επί πλέον τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα σε *in vitro* διατάξεις, καθόσον τα λεμφοκύτταρα επωάστηκαν και καλλιεργήθηκαν με τις ποσότητες του εκχυλίσματος που ελέγξαμε.

Ωστόσο, μέσα στο πλαίσιο της έρευνας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας υποστηρίχτηκε πρόσφατα μια διδακτορική διατριβή η οποία ανέλυσε το ζήτημα της δράσης μιας σειράς τύπων μορίων επί της λειτουργικότητας των λεμφοκυττάρων NK. Μια από τις διαπιστώσεις της εν λόγω διατριβής ήταν ότι μερικές ουσίες φυσικής προελεύσεως, προικισμένες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ήσαν σε θέση να αυξήσουν κατά πολύ την κυτταροτοξική ικανότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων. Π.χ. το ασκορβικό οξύ και τα φλαβονοειδή απιγενίνη και γενιστεΐνη, είναι σε θέση να αυξήσουν την κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων NK σε ποσοστά μεγαλύτερα του 200 %, πράγμα το οποίο προσεγγίζει την αύξηση της συγκεκριμένης παραμέτρου που παρατηρούμε και με την δράση του φυτικού εκχυλίσματος (449).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στην εν λόγω διατριβή ο συγγραφέας μελέτησε επίσης και την δράση ορισμένων πολύ εξειδικευμένων

χημικών ενώσεων, οι οποίες ονομάζονται «παγιδευτές της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής» (spin traps) και έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες βραχύβιες ελεύθερες ρίζες και να δεσμεύουν το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό τους, το οποίο υφίσταται έναν απεντοπισμό στο μοριακό τροχιακό της συνιστάμενης ένωσης.

Ο απεντοπισμός του ασύζευκτου ηλεκτρονίου προκαλεί ταυτοχρόνως δύο φαινόμενα: ένα φαινόμενο *quenching*, δηλαδή κβαντικής εκτόνωσης της συνθήκης μη σύζευξης του ηλεκτρονίου και ένα φαινόμενο απαλοφής της ενέργειάς του σε ένα μεγαλύτερο και συνθετότερο μοριακό τροχιακό, οπότε η πυκνότητα της ενέργειας ανά μονάδα χώρου μειώνεται.

Συνεπώς ο παγιδευτής της ηλεκτρονικής ιδιοστροφορμής μετατρέπεται και αυτός σε ελεύθερη ρίζα, η οποία είναι σταθερότερη από εκείνη με την οποία αλληλεπιδράσε, οπότε η διάρκεια ημιζωής της είναι μεγαλύτερη.

Μια ελεύθερη ρίζα με αρκούντως μεγάλη διάρκεια ημιζωής μπορεί να καταγραφεί μέσω της φασματοσκοπίας Συντονισμού του Ηλεκτρονικού Spin (ESR spectroscopy) πράγμα που μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για την δομική φύση της αρχικής ελεύθερης ρίζας. Οι spin traps είναι δηλαδή αναλυτικά εργαλεία για την ποιοτική ανάλυση των ελευθέρων ριζών, αλλά στην προκειμένη περίπτωση αυτό που αναδύθηκε είναι ότι οι εν λόγω ουσίες αύξαιναν κατά πολύ την κυτταροτοξικότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων.

Συνεπώς, ο κοινός τόπος μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των spin traps ήταν το αδιαφιλονίκητο γεγονός ότι και οι δύο κατηγορίες μορίων συλλάμβαναν ελεύθερες ρίζες οι οποίες προφανώς παραγόταν από τα κυτταρικά συστήματα που μελετούσαμε. Τα κυτταρικά συστήματα ήσαν, εν προκειμένου, τα λεμφοκύτταρα NK, καθώς και τα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιούντο ως στόχοι τους.

Το λογικό συμπέρασμα της εν λόγω ανάλυσης είναι ότι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών παραγομένων είτε από τα λεμφοκύτταρα NK, είτε από τα καρκινικά κύτταρα, ή και από τις δύο κατηγορίες κυττάρων, είχε ως συνέπεια την αύξηση της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων.

Μια άλλη διδακτορική διατριβή που υποστηρίχτηκε μερικά χρόνια πριν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας έδειξε ότι το ασκορβικό οξύ ήταν σε θέση να

λειτουργήσει κυτταροτοξικά απέναντι σε καρκινικά κύτταρα τύπου He La, αλλά οι τοξικές συγκεντρώσεις ήσαν πολύ υψηλές (επιπέδου 5 mM) (450).

Σε άλλη διδακτορική διατριβή, που βρίσκεται στο στάδιο της ολοκλήρωσης, είδαμε μια υψηλή κυτταροτοξικότητα της γενιστεΐνης, της απιγενίνης, όπως και μιας σειράς άλλων φλαβονοειδών και εν γένει φαινολικών παραγώγων φυσικής προέλευσης.

Εδώ η κυτταροτοξικότητα των φλαβονοειδών και των φαινολικών παραγώγων εμφανίζεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από εκείνες του ασκορβικού οξέος με IC_{50} όχι μεγαλύτερη των 25 μ M. Στα πειράματα της εν λόγω διατριβής μια από τις χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα του επίμουσ Wistar, τα οποία χρησιμοποιήσαμε ως κύρια σειρά μας και για την πραγματοποίηση της ανά χειράς διδακτορικής διατριβής.

Από τα ανωτέρω δεδομένα φαίνεται πολύ πιθανόν ότι η αντικαρκινική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήσαμε, σχετίζεται στενά με το περιεχόμενό τους σε αντιοξειδωτικά μόρια, όπως οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή και ενδεχομένως κάποια αντιοξειδωτικά σάκχαρα.

Για να ελέγχουμε αυτή την υπόθεση μελετήσαμε την ολική αντιοξειδωτική ισχύ των εκχυλισμάτων μας, χρησιμοποιώντας μια αναλυτική μέθοδο, που διατίθεται στο εμπόριο από την εταιρεία Randox. Η μέθοδος αυτή είναι προσδιορισμός της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας ή Total Antioxidant Status.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ισχύος του εκχυλίσματος των δύο φυτών είναι πολύ σημαντικά και αποδεικνύουν ότι το μικτό εκχύλισμα εμφανίζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, οπότε είναι σε θέση να ασκήσει μεγάλη εκκαθαριστική δράση σε ελεύθερες ρίζες οι οποίες παράγονται από ποικίλα ενζυμικά συστήματα στο εσωτερικό των κυττάρων, είτε αυτά είναι τα φυσιολογικά φονικά λεμφοκύτταρα, είτε τα παθολογικά εξαλλαγμένα καρκινικά κύτταρα τόσο της ερυθρολευχαιμικής σειράς K – 562, όσο και της λειομυοσαρκωματικής σειράς του επίμουσ Wistar. Το συμπέρασμα είναι ότι τα μόρια που συναπαρτίζουν το εκχύλισμα είναι σε θέση να εκκαθαρίζουν

μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών και συνεπώς να αυξάνουν υψηλά την κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων NK.

Ποια είναι όμως τα ενζυμικά συστήματα τα οποία παράγουν με σταθερό τρόπο μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα μη φυσιολογικά κύτταρα, αντιστοίχως δηλαδή στα λεμφοκύτταρα NK και στα κύτταρα του λειομυσαρκώματος ;

Πρέπει να πούμε ότι η αυθόρμητη παραγωγή ελευθέρων ριζών για σκοπούς φυσιολογικούς στο εσωτερικό των κυττάρων σχετίζεται ξεκάθαρα με τα θεμελιώδη ένζυμα της οδού του αραχιδονικού οξέος, την κυκλοξυγονάση και την λιποξυγονάση, όπως επίσης και με τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώμου P-450, στα οποία εντάσσονται επίσης πρωτεΐνες κυκλοξυγονασικής και λιποξυγονασικής φύσης.

Το κυτόχρωμα P-450 εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο εσωτερικό των μικροσωμάτων, όπου λαμβάνουν χώρα και οι οξειδωτικοί μεταβολισμοί μιας πληθώρας ενδογενών και εξωγενών μορίων, τόσο ατοξικών όσο και τοξικών. Π.χ. η ενεργοποίηση των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (ΠΑΥ) τύπου 3,4-βενζοπυρενίου λαμβάνει χώρα στο κυτόχρωμα P-450 των μικροσωμάτων, οπότε η χημική καρκινογένεση ως διαδικασία ξεκινά από αυτό το σημείο των κυττάρων.

Τα αναγωγικά ισοδύναμα που χρησιμοποιεί το κυτόχρωμα P-450 προκειμένου να λειτουργήσει, προέρχονται από μια NADH – αναγωγή, η οποία είναι δυνατόν να λάβει αναγωγικά ισοδύναμα τόσο από την γλυκόλυση, όσο και από τον κύκλο του Krebs, πράγμα που θα αναλύσουμε παρακάτω. Χωρίς τα αναγωγικά ισοδύναμα δεν είναι δυνατόν να αναχθεί το οξυγόνο ώστε να είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με τα ποικίλα χημικά υποστρώματα του κυτοχρώμου P-450, μεταξύ των οποίων εμπεριέχονται και τα χημικά καρκινογόνα, όπως το B[a]P. Στην ενζυμική δράση του κυτοχρώμου P-450 θα επιστρέψουμε παρακάτω, όταν θα αναφερθούμε στην χημική καρκινογένεση.

Μια άλλη πηγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα προέρχεται επίσης από το μιτοχόνδριο και αποτελεί μια πάγια διαδικασία που σχετίζεται με την φυσιολογική αναπνοή. Αναγκαστικά όταν ο οξυγόνο ανάγεται σε νερό είναι δυνατόν να διέλθει από μια σειρά ενδιάμεσων ενεργών μορίων, όπως είναι το

ανιόν υπεροξειδίου, η οξειδωτική ρίζα υδροξυλίου, καθώς και το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Όταν το μιτοχόνδριο αναπνέει ισχυρά, δηλαδή όταν ο οργανισμός ευρίσκεται υπό συνθήκες έντονης παραγωγής αερόβιου έργου, αυξάνεται λογικά και η παραγωγή ελευθέρων ριζών. Όμως η συνθήκη της ανώμαλα υψηλής παραγωγής ελευθέρων ριζών μπορεί να επισυμβεί σε εκείνες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες έχουμε μετάβαση από μια κατάσταση έλλειψης οξυγόνου, σε μια κατάσταση επάρκειας αυτού, όπως π.χ συμβαίνει όταν μια περίοδος ισχαιμίας λαμβάνει τέλος και μια μεγάλη ποσότητα οξυγόνου εισβάλλει ξανά στην ισχαιμούσα περιοχή, στην οποία η ποσότητα του αναγωγικού δυναμικού είναι ήδη αυξημένη πάνω από το φυσιολογικό [(φαινόμενο ισχαιμίας – επανοξυγόνωσης).

Στην περίπτωση αυτή το συσσωρευμένο αναγωγικό δυναμικό ανάγει το εισερχόμενο οξυγόνο ενεργοποιώντας το, με αποτέλεσμα να παραχθούν τοπικά μεγάλες ποσότητες ενεργών μορφών οξυγόνου, οι οποίες εξ αιτίας της υψηλής τους δραστηριότητας μπορεί να αντιδράσουν βίαια με όλα σχεδόν τα γνωστά βιομόρια, έχοντας μια μεγαλύτερη χημική συγγένεια κατ' αρχήν με τα λιπίδια και εν συνεχεία με άλλα μόρια της βιολογικής μοριακής ιεραρχίας των κυττάρων.

Αναγκαστικά η ύπαρξη πολλών ενεργών μορφών οξυγόνου (ή και άλλων στοιχείων, όπως π.χ των αλογόνων), αποτελεί μια μεγάλη πηγή χημικής φθοράς για τα ωφέλιμα κυτταρικά μόρια, μέσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα πολυνουκλεοτίδια του DNA και RNA.

Συνεπώς αν η παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι σταθερά υψηλή, αναγκαστικά θα είναι σταθερά υψηλή και η πιθανότητα βλαβών σε όλα τα οργανίδια των κυττάρων, όπως επίσης και στα νουκλεϊνικά οξέα. Βέβαια τα κύτταρα αντιστέκονται από τις φθορές τις οφειλόμενες στο οξειδωτικό stress μέσω μιας συστοιχίας γραμμών άμυνας αποτελούμενων από τα γνωστά αντιοξειδωτικά ένζυμα (δισμουτάση του ανιόντος υπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), όπως επίσης και έναν πολύ μεγάλο αριθμό μορίων σχετικά μικρού βάρους, τα οποία είναι προικισμένα με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τα οποία δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών.

Δεν θα αναλύσουμε τις γραμμές της αντιοξειδωτικής άμυνας και την ακριβή τους λειτουργία, αλλά θα υπογραμμίσουμε το γεγονός ότι σε πολλά από τα γνωστά φυτά καταγράφεται η ύπαρξη ενός πολύ μεγάλου αριθμού μορίων, τα οποία είναι σε θέση να αυξήσουν αποφασιστικά την αντοχή των κυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση (stress), επιτρέποντάς τους να λειτουργήσουν τόσο καλύτερα, όσο και μακροχρονιότερα, επεκτείνοντας το προσδόκιμο της επιβίωσής τους, ή ακόμη και την ποσότητα των έργων που είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν μέσω των προγραμματισμένων τους λειτουργιών.

Συνεπώς είμαστε σε θέση να πούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες συμβαίνει μια διαρκής και υψηλή τροφοδοσία των κυττάρων με μια ποικιλία αντιοξειδωτικών παραγόντων διατροφικής, φαρμακολογικής ή συμπληρωματικής προέλευσης, προκύπτει μια αύξηση της αντοχής των κυττάρων απέναντι στα αποσταθεροποιητικά φαινόμενα του οξειδωτικού stress.

Αυτή η αύξηση της αντοχής απέναντι στο οξειδωτικό stress μεταφράζεται σε μια καλύτερη και σταθερότερη λειτουργικότητα του συνόλου των κυτταρικών δομών, η οποία μπορεί να επιφέρει μια αύξηση της διάρκειας ζωής των κυττάρων, ως αθροιστικό αποτέλεσμα της αύξησης της διάρκειας ζωής των βιομορίων των κυττάρων και κυρίως των νουκλεϊνικών οξέων DNA και RNA.

Δηλαδή είναι πιθανόν η αύξηση της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων NK να οφείλεται και σε μια μη εξειδικευμένη και γενική δράση του ευεργετικού αποτελέσματος των αντιοξειδωτικών στο συνολικό μεταβολισμό και στις δομές τους, αλλά βεβαίως και σε εστιασμένες δράσεις, όπως π.χ η τροποποίηση του αραχιδονικού μεταβολισμού.

Ωστόσο τα αντιοξειδωτικά δεν φαίνεται να δρουν ευεργετικά για τα κακοήθη κύτταρα και είναι πιθανόν η μείωση της παραγωγής λειτουργικών ελευθέρων ριζών τουλάχιστον από τα ένζυμα κυκλοξυγονάση και λιποξυγονάση, να είναι σε θέση να εμποδίσει την ενεργοποίηση γονιδίων, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων έχουν προστατευτική σημασία για το κακόηθες κύτταρο.

Δεν πρέπει να ξεχνούμε ότι το καρκινικό κύτταρο είναι ένα ανάπηρο βιολογικό σύστημα με σοβαρές βλάβες και προκειμένου να ομοιοστατεί

χρησιμοποιεί μια διέγερση της έκφρασης πολλών γονιδίων έτσι ώστε να επιτύχει μια εξισορρόπηση των ανεπαρκειών που έχουν δημιουργηθεί από τις βλάβες του γενετικού του υλικού.

Ένας σημαντικός μηχανισμός της διέγερσης αρκετών συστοιχιών γονιδίων είναι ο μηχανισμός της φλεγμονής, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή ενδογενών και εξωγενών διαβιβαστικών μορίων, των προστανοειδών, τα οποία είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος και γενικότερα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με 20 άτομα άνθρακος.

Η αναστολή των ενζύμων του αραχιδονικού μεταβολισμού επιφέρει τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή τα καθιστά εξαιρετικά ευάλωτα σε καταστάσεις stress, περιλαμβανομένων και των διαφόρων κυτταροτοξικών παραγόντων. Συνεπώς η δράση συνόλων μορίων, όπως του μελετηθέντος μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, είναι σε θέση να οδηγήσει τα καρκινικά κύτταρα στον θάνατο, μέσω αντιφλεγμονωδών δράσεων, αλλά και δράσεων κυτταροτοξικών, βασιζόμενων επί αντιοξειδωτικών μορίων.

Δεν θα αναλύσουμε την πολύ εκτεταμένη και πολύ σημαντική και ενδιαφέρουσα βιβλιογραφία της δράσης των αντιοξειδωτικών επί του προσδόκιμου επιβίωσης μέσω προφύλαξης των φθορών του οργανισμού από την ανώμαλη οξειδωση, ή βελτίωσης των λειτουργιών αυτού απομακρύνοντας την οξειδωτική φθορά, αλλά θα προσπαθήσουμε να επικεντρωθούμε στο τι σημαίνουν όλα αυτά για τις βιολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων μας στα μελετηθέντα μοντέλα του καρκίνου. Οι αναφορές που μόλις πραγματοποιήσαμε στα ανωτέρω σημεία του κειμένου ήσαν επιβοηθητικές προκειμένου να στηρίξουμε καλύτερα την ερμηνευτική των φαινομένων που παρατηρήθηκαν από τις μελέτες μας.

Είδαμε λοιπόν μέσω της δοκιμασίας της ολικής αντιοξειδωτικής ισχύος ότι όντως το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών έχει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, την οποία ωστόσο δεν μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε στη βάση της μοριακότητας των διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών που περιέχει, αλλά στη βάση της ποσότητας του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήσαμε σε κάθε δοκιμή.

Η ποσότητα εκχυλίσματος που εμφανίζει ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που αντιστοιχεί μεταξύ των οπτικών απορροφήσεων 0,100 και 0,150 στην δοκιμασία της Randox, είναι εκείνη που αντιστοιχεί στις δόσεις των 5 και 7,5 mg εκχυλίσματος, μεταξύ των οποίων έχουμε τον θάνατο όλων των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων στο τρυβλίο.

Συνεπώς μια ουσία με Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα αυτού του επιπέδου θα ήταν δυνατόν να σκοτώσει όλον τον κυτταρικό πληθυσμό των νεοπλασματικών κυττάρων, αν θεωρήσουμε ότι η *in vitro* κυτταροτοξικότητα του εκχυλίσματος είναι μονοσήμαντο αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής ιδιότητας των μοριακών του συστατικών. Δηλαδή αν υιοθετήσουμε την άποψη ότι οποιαδήποτε αντιοξειδωτική ουσία εμφανίζει κυτταροτοξικότητα εναντίον των νεοπλασματικών κυττάρων, λόγω ακριβώς των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων, τότε για την συγκεκριμένη νεοπλασματική κυτταρική σειρά θα αρκούσε μια συγκέντρωση της θεωρούμενης αντιοξειδωτικής ουσίας, τέτοια ώστε η Ολική Αντιοξειδωτική Ισχύς της να αντιστοιχεί σε μια οπτική απορρόφηση μεταξύ των 0,100 και 0,150 με την δοκιμή της Randox.

Φυσικά οι μεγαλύτερες Ολικές Αντιοξειδωτικές Ικανότητες που θα αντιστοιχούσαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της θεωρούμενης αντιοξειδωτικής ουσίας, θα ήταν επίσης θανατηφόρες, ενώ οι μικρότερες από αυτό το συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό κατώφλι δεν θα ήσαν σε θέση να προκαλέσουν τον θάνατο όλου του νεοπλασματικού καρκινικού πληθυσμού.

Η υπόθεση αυτή μπορεί να αποτελέσει έναν μπούσουλα για την μελλοντική αναλυτική διερεύνηση του κατά πόσον τα αντιοξειδωτικά είναι γενικά σε θέση, λόγω και μόνον της αντιοξειδωτικής τους ισχύος να προκαλέσουν θάνατο στα καρκινικά κύτταρα, είτε κάθε είδους – αν όντως κάθε τύπος καρκινικού κυττάρου είναι ευάλωτος στην χημική ιδιότητα της αντιοξειδωτικότητας, η οποία είναι ικανότητα αναγωγής, δηλαδή προσφοράς ηλεκτρονίων, ή αναγωγικών ισοδυνάμων – είτε μόνον εκείνων των τύπων που εμφανίζουν ειδική ευαισθησία επί των αντιοξειδωτικών ουσιών.

Ωστόσο φαίνεται ότι δεν αρκεί από μόνη της η αντιοξειδωτική ικανότητα να αποτελεί μια συνθήκη θανάτου για τον καρκίνο, αλλά εμπλέκονται προφανώς και άλλες ιδιότητες σχετιζόμενες με την δομή και την ειδική διαλυτότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών.

Αν και δεν υπάρχουν προς το παρόν καλώς επεξεργασμένα δεδομένα που να θέτουν σε συσχέτιση την αντιοξειδωτική ικανότητα με τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων από αντιοξειδωτικές ουσίες, εν τούτοις μέσα στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήσαμε το κατά πόσον το εκχύλισμα είναι σε θέση να αναστείλει το ένζυμο λιποξυγονάση, το οποίο συμμετέχει στην αραχιδονική οδό και του οποίου η αναστολή έχει σαν αποτέλεσμα των θάνατο των καρκινικών κυττάρων εν γένει.

Η εν λόγω επιλογή έγινε βασιζόμενη επί δύο δεδομένων:

1^ο) επί της διεθνούς βιβλιογραφίας η οποία συσχετίζει την αναστολή των διαφόρων τύπων λιποξυγονάσης με αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου σε καλλιέργειες εν γένει νεοπλασματικών κυττάρων.

2^ο) από μια σειρά μετρήσεων που πραγματοποιήσαμε παράλληλα με την εκπόνηση της εν λόγω διατριβής, όπου αποδεικνύαμε ότι μια ποικιλία αντιοξειδωτικών μορίων, όπως το ασκορβικό οξύ, η ανηγμένη γλουταθειόνη, δύο spin traps (2 – μεθύλ – 2 – νιτρώδες προπάνιο [MNP] και tert – φαινύλ – νιτρώδες βουτύλιο [PBN], η L – κυστεΐνη, το μερκαπτοηλεκτρικό οξύ κ.α., τα οποία επίσης αναστέλλουν δόσοεξαρτώμενα την λιποξυγονάση *in vitro*.

Από πειράματα που είχαν λάβει χώρα μέσα στο πλαίσιο δύο άλλων διατριβών σχετιζομένων με τις δράσεις μιας ποικιλίας αντιοξειδωτικών παραγόντων στην διαδικασία της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, είχαμε προσδιορίσει ότι ένας μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών παραγόντων, ήταν σε θέση να αναστείλουν πλήρως τα αιμοπετάλια του ανθρώπου *ex vivo* και τα πλυμένα αιμοπετάλια του κουνελιού *in vitro*.

Η δράση των εν λόγω αντιοξειδωτικών ουσιών εμφάνιζε μια εκλεκτικότητα στην αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης μέσω της τρίτης οδού συσσώρευσης, δηλαδή της σχετικής με τον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor ή συντομογραφικώς PAF).

Επειδή τα δεδομένα αυτά εξήχθησαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και τις αρχές εκείνης του 1990, οι τότε υφιστάμενες μελέτες υποδείκνυαν μια συσχέτιση της λιποξυγονάσης με την οδό του PAF. Εμείς διαπιστώσαμε ότι οι ίδιοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες που ανέστειλαν τον PAF στα αιμοπετάλια, ανέστειλαν ταυτοχρόνως και την 5–λιποξυγονάση *in vitro*. Μέσα στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβανόταν και η φαρμακευτική ουσία

τριμεταζιδίνη, η οποία αποτελούσε τον πρώτο συνθετικό εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών που φαρμακοποιήθηκε, λόγω αυτής του της ιδιότητας, ως φάρμακο για την αντιμετώπιση των φαινομένων της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου και άλλων ιστών στο ζώο και στον άνθρωπο.

Έχοντας σαν πρότυπη ουσία την τριμεταζιδίνη είχαμε διαπιστώσει ότι και άλλοι γνωστοί εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών (αλλά και αντιοξειδωτικά) ήσαν σε θέση να αναστείλουν τον PAF, κατ' αρχάς, αλλά εν συνεχεία και τις άλλες οδούς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Ταυτοχρόνως αποδείξαμε ότι οι εν λόγω ουσίες ανέστειλαν και την λιποξυγονάση σε ένα μοντέλο αντίδρασης *in vitro*..

Μεταξύ αυτών των αντιοξειδωτικών παραγόντων και εκκαθαριστών ελευθέρων ριζών, περιλαμβανόταν το ασκορβικό οξύ, η ανηγμένη γλουταθειόνη, η Ν-ακετυλο-κυστεΐνη, η L-κυστεΐνη, η D-κυστεΐνη, η μερκαπτοπροπιονύλ-γλυκίνη (ή θειόλα), η κυστεαμίνη, το μερκαπτοηλεκτρικό οξύ, η διθειοθρεΐτόλη, το μερκαπτονικοτινικό οξύ, το θεισαλικυλικό οξύ, αλλά και η συνθετική τριμεταζιδίνη (τριμεθοξυ-φαινύλ-πιπεραζίνη). Πολύ σημαντική είναι η επισήμανση ότι οι δύο προαναφερθέντες spin traps είναι και αυτοί καλοί αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, με κάποια εκλεκτικότητα ως προς την οδό του PAF, της οποίας κρίσιμο ένζυμο φαίνεται η λιποξυγονάση, διότι ο εκλεκτικός της αποκλεισμός αναστέλλει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλεί ο PAF.

Εκτός όμως από τις παραπάνω διαπιστώσεις τις σχετικές με τον μηχανισμό της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, παράλληλα, γύρω στα τέλη της δεκαετίας του '80 είχε τεκμηριωθεί, από το Εργαστήριό μας η άποψη ότι πολλοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες ήσαν σε θέση να αναστείλουν την χημική καρκινογένεση, που προκαλούσε στους επίμυες Wistar το βενζοπυρένιο.

Συγκεκριμένα, η μελέτη της *in vivo* καρκινογένεσης μας έδειξε ότι μερικοί σκόπιοι συνδυασμοί κάποιων συνήθων αντιοξειδωτικών παραγώγων είχαν την ιδιότητα να αναστέλλουν ή και να μεταβάλουν την χημική καρκινογένεση που προκαλούν ουσίες όπως το B[a]P, πράγμα που υποδείκνυε ότι ο όλος μεταβολισμός του εν λόγω πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα, σχετιζόταν στενά με αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών, οι οποίες ενσωματωνόταν σε δεδομένα σημεία του μορίου του B[a]P,

μετατρέποντάς το από αδρανές σε ενεργό. Η μετατροπή του B[a]P σε ένα ορισμένο δι-ϋδροξυπαράγωγο (8,9-δι-ϋδροξυ-B[a]P-διόλη) αποτελεί την επικρατέστερη άποψη για τον τελικό καρκινογόνο μεταβολίτη αυτού που ενσωματώνεται στο DNA, προκαλώντας εκείνες τις τυπικές βλάβες στις αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων και κατόπιν την θραύση του DNA και την απώλεια τμημάτων του (απώλεια ρυθμιστικής πληροφορίας), που αν μονιμοποιηθούν θα οδηγήσουν στην εμπέδωση της κακοήθους εξαλλαγής και ενδεχομένως στην γένεση της νεοπλασματικής νόσου, σε ένα δεύτερο στάδιο.

Το B[a]P αποτελεί όπως προείπαμε ένα πλήρες καρκινογόνο, δηλαδή μια ουσία η οποία προκαλεί ταυτόχρονα τα δύο πρώτα στάδια της χημικής καρκινογένεσης, δηλαδή την έναρξη και την προαγωγή. Οι κλασσικές μελέτες της χημικής καρκινογένεσης διέκριναν σε αυτήν την ύπαρξη, δύο στάδια, εκ των οποίων το πρώτο ονομάστηκε έναρξη και το δεύτερο προαγωγή.

Οι ουσίες που πραγματοποιούσαν την έναρξη ήσαν διαφορετικές από εκείνες οι οποίες πραγματοποιούσαν την προαγωγή. Π.χ. η καρκινογένεση μέσω δι-μέθυλο-βένζο-ανθρακενίου (DMBA), απαιτεί την χορήγηση αυτού στο πειραματόζωο και κατόπιν την χορήγηση ενός δευτέρου χημικού παράγοντα (παλαιά ήταν το έλαιο το φυτού κρότωνα και κατόπιν το ενεργό του συστατικό, δηλαδή ο οξικός εστέρας της μυριστικής φορβόλης).

Οι μελέτες έδειξαν ότι δύο αυτά τα βήματα πρέπει να είναι στενά γειτονικά μέσα στον χρόνο και σαφώς διαδοχικά (πρώτα το καρκινογόνο και μετά η προαγωγός ουσία). Η εμβάθυνση στις δράσεις τους επί του DNA έδειξε ότι το χημικό καρκινογόνο ενσωματωνόταν κυρίως στις βάσεις των νουκλεοτιδίων, ενώ η προαγωγική ουσία προκαλούσε την παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες επίσης έθιγαν το DNA πολλαπλώς, οπότε υπερφόρτωναν την λειτουργία του συστήματος των ενζύμων της επιδιόρθωσής του, υφιστάμενο πλήρη κορεσμό, με αποτέλεσμα κάποιες βλάβες αυτού να μην είναι σε θέση να επιδιορθωθούν και να μονιμοποιηθούν δίνοντας έτσι γένεση στην κακοήθη εξαλλαγή.

Με αυτή τη λογική, αν η χρήση του προαγωγικού παράγοντα ήταν απαραίτητη για αρκετούς ΠΑΥ, εν τούτοις στην περίπτωση του B[a]P υπήρχε μια εξαίρεση, καθόσον αυτό ήταν σε θέση να προκαλέσει καρκίνο χωρίς την ανάγκη προαγωγικής ουσίας και συνεπώς ήταν ένα πλήρες καρκινογόνο.

Αυτή του η ιδιότητα αποτέλεσε και τον βασικό λόγο για τον οποίο το επιλέξαμε ως κύριο μέσο καρκινογένεσης στα πειράματά μας. Η λογική δράσης του 3,4-βενζοπυρενίου ήταν ότι κατά την σειρά των μεταβολικών του μετατροπών μέσω της δράσης των ενζύμων του κυτοχρώμου P-450 με τη προσθήκη ενεργοποιημένων μορφών οξυγόνου (ενδεχομένως ελευθέρων ριζών ανιόντος υπεροξειδίου ή ελευθέρων οξειδωτικών ριζών υδροξυλίου), προέκυπταν μεταβολικά παράγωγα τύπου 7,8 δι-υδρόξυ B[a]P-δι-αλκοολών όπως ο προαναφερθείς θεωρούμενος ως τελικός δραστικός μεταβολίτης του B[a]P, τα οποία δημιουργούσαν επαναλαμβανόμενους οξειδαναγωγικούς κύκλους, οξειδούμενα αμέσως σε κετόνες (δι-κετόνες) και επαναναγόμενα εκ νέου σε δι-αλκοόλες.

Σε κάθε πλήρη περιστροφή του οξειδαναγωγικού κύκλου, από την διακυκλική μορφή του B[a]P στην δικετονική και το αντίθετο, μεσολαβούσε αναγκαστικά η παραγωγή μιας ελεύθερης ρίζας ανιόντος υπεροξειδίου $[O_2]^{-1}$ η οποία, είτε υπό αυτή την μορφή είτε μετατρεπόμενη σε άλλη, ήταν σε θέση να δώσει βλάβες στο DNA, ανεξάρτητες από εκείνες που προκαλούσε η αντίδραση του τελικού δραστικού μεταβολίτη του B[a]P με το DNA του θιγόμενου κυττάρου, που αποτελούσε και το θέατρο του μεταβολισμού του καρκινογόνου.

Είναι πολύ σημαντικό να σημειώσουμε εδώ ότι ο μεταβολισμός μιας τυπικής προαγωγικής ουσίας (του τύπου των εστέρων της μυριστικής φορβόλης, που αποτελούν συστατικά του κροτωνελαίου) δια του κυτοχρώμου P-450 συνοδεύεται από την παραγωγή ενός καταρράκτη ελευθέρων ριζών τύπου ανιόντος υπεροξειδίου, κατ' αρχάς και εν συνεχεία και άλλων μορφών, όπως $OH\cdot$, H_2O_2 και μονήρους $[O]$.

Στα πειράματα που έγιναν κατά την δεκαετία του 1980 στο Εργαστήριό μας είχαμε σταδιακά μελετήσει τις δράσεις μιας σειράς αντιοξειδωτικών μορίων επί της καρκινογόνου δράσης του B[a]P στους επίμυες Wistar.

Αυτό που είχε αναδυθεί από τα πειράματα της πρώτης πενταετίας του '80 ήταν ότι η χρήση ενός υδατοδιαλυτού αντιοξειδωτικού όπως η βιταμίνη C, δεν προκαλούσε σε κάποιο ποσοστό πλήρη αναστολή της καρκινογένεσης αλλά ένα παράδοξο φαινόμενο που περιγραφόταν ως επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης, σε μερικά από τα ζώα των ομάδων που λάμβαναν το εν λόγω αντιοξειδωτικό, ενώ παραλλήλως επέφερε μία μείωση του

προσδόκιμου επιβίωσης σε έναν μικρό αριθμό ζώων. Το αντιφατικό αυτό διπλό δεδομένο επαναλαμβανόταν σταθερά σε έναν αριθμό πειραμάτων, όπου ως αναστολέας χρησιμοποιούταν η βιταμίνη C, ακόμη και αν η ποσότητά της στα πόσιμα διαλύματα των ζώων ήταν πολύ υψηλή (10 g / L ποσίμου νερού).

Στα πειράματα εκείνης της περιόδου η έναρξη της χορήγησης ασκορβικού οξέος λάμβανε χώρα αμέσως μετά την έγχυση του καρκινογόνου και διαρκούσε μέχρι τον θάνατο του πειραματόζωου, οπότε ουσιαστικά ελέγχαμε την χημική καρκινογένεση και στις τρεις φάσεις της, δηλαδή στην έναρξη και την προαγωγή, αλλά και στην προώθηση, οπότε δεν ήμασταν σε θέση να διακρίνουμε την ενδεχόμενη εκλεκτικότητα αναστολής εκ μέρους του αντιοξειδωτικού παράγοντα σε μια από αυτές τις τρεις φάσεις. Κατόπιν έγιναν και άλλα πειράματα όπου η χορήγηση του αντιοξειδωτικού έγινε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με αποτέλεσμα να εκτιμήσουμε την ένταση της δράσης του σε κάθε μια από τις τρεις φάσεις ανάπτυξης του καρκίνου.

Εκείνη την εποχή δεν υπήρχε η δυνατότητα της κυτταροκαλλιέργειας οπότε τα πειράματά μας σχεδιαζόταν αποκλειστικά στο *in vivo* μοντέλο, που ήταν αναγκαστικά και πολύπλοκο, δύσκολο στους χειρισμούς, αλλά και ιδιαίτερος χρονοβόρο καθώς για να έχουμε έγκυρα αποτελέσματα έπρεπε να περιμένουμε χρονικά διαστήματα που προσέγγιζαν και συχνά υπερέβαιναν το ένα έτος. Επίσης τα πειράματα αυτά ήταν και επικίνδυνα τόσο για τον πειραματιστή, όσο και για τους υπαλλήλους του εκτροφείου των πειραματόζωων, εξ αιτίας των μεγάλων ποσοτήτων του Β[a]P που χρησιμοποιούσαμε και μάλιστα σε εγκαταστάσεις στοιχειώδεις που μόλις ικανοποιούσαν τις προδιαγραφές των σύγχρονων εκτροφείων.

Η επισκόπηση των πρώτων πειραμάτων επί της αναστολής και τροποποίησης της χημικής καρκινογένεσης μας έδειξε ότι η παράδοση συμπεριφορά της βιταμίνης C φαινόταν να συνδέεται με τον ιστολογικό τύπο των όγκων που δημιουργούσε το 3,4-βενζοπυρένιο: Τα ζώα που έφεραν καλώς διαφοροποιημένους όγκους, όπως π.χ τα ινοσαρκώματα ήταν εκείνα τα οποία έδειχναν να ωφελούνται από την χορήγηση της βιταμίνης C. Αντιθέτως τα ζώα τα οποία έφεραν αδιαφοροποίητους ή και μικτούς όγκους συνήθως επιβίωναν λιγότερο σε σύγκριση με τα ζώα της Ομάδας Ελέγχου.

Δηλαδή φαινόταν ότι το χρησιμοποιούμενο αντιοξειδωτικό είχε διαφορετική επίπτωση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του νεοπλασματος, συναρτήσει του βαθμού διαφοροποίησης ή της εσωτερικής ιστοπαθολογικής ποικιλομορφίας των κακοηθών κυττάρων του, πράγμα που σήμαινε ότι στην πρώτη περίπτωση η βιταμίνη C επιβράδυνε την αύξηση των όγκων, ενώ στην άλλη την επιτάχυνε, χωρίς ωστόσο να υποδεικνύεται κάποιος μηχανισμός για την εν λόγω διχοστασία. Ωστόσο, από την άλλη πλευρά θα μπορούσε να προτείνει κάποιος ότι το ασκορβικό οξύ δεν δρούσε επί του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά απλώς σε εκείνες τις περιπτώσεις όπου είχε αναστείλει επαρκώς το B[a]P είχαν προκύψει οι πλέον διαφοροποιημένες μορφές όγκων οι οποίες εμφάνιζαν και μικρότερο ρυθμό αύξησης εξ αιτίας του μικρότερου ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων τους, πράγμα το οποίο δεν ίσχυε για τους μικτούς και τους αδιαφοροποίητους όγκους. Πειράματα που έγιναν είκοσι χρόνια μετά απέδειξαν την ισχύ και των δύο αυτών υποθέσεων.

Περί τα μέσα του 1984 χορηγήσαμε μαζί με την βιταμίνη C και μια μορφή βιταμίνης E στους επίμυες Wistar αμέσως μετά την χορήγηση του B[a]P και έως την ημέρα του θανάτου αυτών. Εδώ διαπιστώσαμε ότι η προσθήκη της βιταμίνης E (μια μορφή οξικής α-τοκοφερόλης που παρασκεύαζε η La Roche) επέφερε μια σοβαρή μεταβολή στο προφίλ της χημικής καρκινογένεσης: αφ' ενός μεν προκαλούσε πλήρη αναστολή της καρκινογόνου δράσης του B[a]P στο 16 % των ζώων – τα οποία παρέμειναν χωρίς να αναπτύξουν όγκους για όλη την ζωή τους (περί τα δύο χρόνια), ενώ, από την άλλη πλευρά σημειωνόταν μια επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης συνολικά των ζώων και μια καθυστέρηση της εμφάνισης των κακοηθών όγκων – οι οποίοι ιστολογικά περιλάμβαναν και όγκους αρκετά διαφοροποιημένους που επιδείκνυαν πολύ βραδεία ανάπτυξη.

Τα πειράματα στα οποία μαζί με το ασκορβικό οξύ είχε προστεθεί και η α-τοκοφερόλη επαναλήφθηκαν με την χρήση και μεγαλύτερων ποσοτήτων βιταμίνης E, με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της αναστολής της καρκινογένεσης σε τιμές μεγαλύτερες του 20 % του αριθμού των πειραματόζων. Στα εν λόγω πειράματα παρατηρήθηκε επίσης και μια αύξηση της διαφοροποίησης των μορφωμάτων που δημιουργήθηκαν, μεταξύ

των οποίων συμπεριλαμβανόταν και ένας καλοήθης όγκος που διαγνώστηκε παθολογοανατομικά ως αθηρωματική κύστη.

Τέλος η πραγματοποίηση μιας άλλης μελέτης στην οποία μαζί με το ασκορβικό οξύ και την α-τοκοφερόλη προσετέθη και το β-καροτένιο, ως τρίτος ανασταλτικός παράγοντας, έδειξε μια ακόμη μεγαλύτερη αναστολή της χημικής καρκινογένεσης.

Τα εν λόγω αρθρωτά πειράματα ήσαν εξαιρετικά μακροχρόνια, καθόσον η μέση χρονική τους διάρκεια του καθενός εξ αυτών ήταν περί τους 38 μήνες και οπωσδήποτε γινόταν σε μεγάλους αριθμούς πειραματόζωνων, έτσι ώστε τα στατιστικά δείγματα να είναι επαρκή για την εξαγωγή καθαρών συμπερασμάτων. Μόνον το μοντέλο της χημικής καρκινογένεσης με το B[a]P για να τυποποιηθεί απαίτησε τον πειραματισμό επί 6.000 επίμυων Wistar και ενός επίσης πολύ μεγάλου αριθμού μυών NMRI (Naval Medical Research Institute).

Μερικά από τα θεμελιώδη συμπεράσματα που εξήχθησαν ήσαν και τα εξής:

1^{ov}) Τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά ενδεχομένως αποτελούσαν αναστολείς των αμιγώς καρκινογόνων μεταβολιτών, που ήσαν και οι διάφοροι μεταβολίτες του B[a]P, όπως π.χ η 7,8-δι-ϋδροξυ-B[a]P-διόλη και που ταυτοχρόνως ήσαν οι εναρκτές της καρκινογένεσης, δηλαδή τα μόρια που πραγματοποιούσαν το στάδιο της έναρξης.

2^{ov}) Τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά ενδεχομένως αποτελούσαν τους αναστολείς της προαγωγής, καθόσον εμφάνιζαν μια εκλεκτικότερη εκκαθαριστική δράση επί των «προαγωγικών» ελευθέρων ριζών και των λοιπών μορφών ενεργοποιημένου οξυγόνου ($[O\cdot_2]^{-1}$, $OH\cdot$, H_2O_2 και μονήρους $[O]$).

3^{ov}) Λιποδιαλυτά ή αμφίφιλα αντιοξειδωτικά, όπως π.χ ο οξικός εστέρας της α-τοκοφερόλης και ακόμη καλύτερα το β-καροτένιο, μπορούσαν να λειτουργήσουν και ως εκκαθαριστές του ενεργού ατομικού οξυγόνου $[O]$, που απελευθερωνόταν από την διάσπαση του H_2O_2 .

4^{ov}) Μέταλλα όπως το Σελήνιο, υπό την μορφή αλάτων σεληνώδους νατρίου, θα μπορούσαν να παίξουν τον ρόλο επαγωγέων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης τα οποία μετατρέπουν

υπεροξειδία σε αλκοόλες και συνεπώς να τύχουν μιας δράσης επί της μετατροπής υπεροξειδίων του B[a]P σε B[a]P-διαλκοόλες και δικετόνες.

5^{ov}) Ενδεχομένως όλες οι αντιοξειδωτικές ουσίες που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να έχουν επίσης κάποια αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο ή με τις πεπτιδικές αλυσίδες των ενζύμων του κυτοχρώμου P-450, ούτως ώστε να προκαλέσουν μια δυσκολία ή επιβράδυνση της λειτουργικότητας αυτού, οπότε ο ρυθμός της αντίδρασης με το B[a]P θα ελαττωνόταν, πράγμα που θα σήμαινε μικρότερο ρυθμό παραγωγής ενεργών μορίων και συνεπώς μικρότερο ρυθμό τραυματισμού του DNA, οπότε καλύτερη απόδοση των ενζύμων επιδιόρθωσης των βλαβών του.

Γενικά οι διάφορες μορφές εκκαθαριστών μικρού μοριακού βάρους θα μπορούσαν να αναστείλουν ενεργοποιημένα μόρια B[a]P, αντιδρώντας με αυτά στο κατάλληλο κυτταρικό περιβάλλον, άλλες μορφές ελευθέρων ριζών (καρβοκατιόντα), αλλά και απλές ελεύθερες ρίζες, όπως οι προαναφερθείσες ανωτέρω, καθόσον η εκλεκτικότητά τους να μην υφίσταται, αλλά εξ αιτίας της ενεργότητας των ελευθέρων ριζών πάντοτε μπορούν να τις δεσμεύσουν ελλείψει ενός καλύτερου εκκαθαριστικού μορίου.

Η μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας και η συσχέτιση των ερευνητικών πεδίων γύρω από τον μηχανισμό της χημικής καρκινογένεσης και τον μηχανισμό της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης επέτρεψε σταδιακά να αναδυθεί μια εικόνα που έδειχνε μεγάλες ομοιότητες σε αυτούς τους μηχανισμούς, οι οποίοι υπερέβαιναν τον κοινό τόπο της παραγωγής ελευθέρων ριζών και προχωρούσαν σε στοιχεία περισσότερο δομικά και λειτουργικά. Π.χ. το κυτόχρωμα P-450 των κανονικών εμπύρηνων κυττάρων και η κυκλοξυγονάση των αιμοπεταλίων, δια της οποίας το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται σε προσταγλανδίνες, φαινόταν να έχουν από κοινού αρκετά δομικά στοιχεία, μέσα στα οποία περιλαμβάνονταν η ομάδα της αίμης με τον σίδηρο στο καταλυτικό κέντρο αυτής, κοινά φασματοσκοπικά αποτυπώματα, αλλά και την ικανότητα μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος.

Ο ασπιρινισμός των αιμοπεταλίων είχε ως αποτέλεσμα την μη ανιστρεπτή αναστολή της κυκλοξυγονάσης και την εξουδετέρωση της αραχιδονικής οδού αιμοπεταλιακής συσσώρευσης, αλλά από την άλλη πλευρά η ασπιρίνη και άλλα στεροειδή αντιφλεγμονώδη έδειξαν εκτός από την θρόμβωση να αναστέλλουν σαφώς και την καρκινογένεση,

υποδεικνύοντας ως ποιητικό της αίτιο την αναστολή των κυτοχρωμάτων P-450 των κυττάρων.

Δεν πρέπει να μας διαφεύγει ότι η ασπιρίνη είναι το γνωστό ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ένα μόριο που προέρχεται από τους φλοιούς και τα φυλλώδη τμήματα της ιτιάς (*Salix alba*). Το μόριο της ασπιρίνης λειτουργεί σαφώς και ως εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών, αλλά κατέχει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εκτός του γεγονότος ότι μπορεί να αντιδράσει με την αίμη της κυκλοξυγονάσης και να παρεμποδίσει την ενζυμική οξειδωση του αραχιδονικού οξέος προς παραγωγή προσταγλανδινών.

Συνολικά εκείνο που αναδύθηκε από την μακροχρόνια μελέτη, τόσο στο ερευνητικό μικροπεριβάλλον του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, όσο και στο μακροπεριβάλλον της διεθνούς έρευνας, ήταν η ύπαρξη μιας εξαιρετικής προσπάθειας για την ενοποίηση - τόσο επί του αποδεικτέου αλλά και σε θεωρητικό επίπεδο - σημαντικών φυσιοπαθολογικών μηχανισμών, με την χρήση μιας σειράς ενοποιητικών μέσων, ένα από τα οποία ήσαν οι έννοιες της οξειδαναγωγής και οι δράσεις των ποικίλων αντιοξειδωτικών μορίων με τα οποία η εξέλιξη προίκισε τα έμβια όντα και συνεπώς τα ανώτερα θηλαστικά και τον άνθρωπο.

Η νέα αυτή σύνθεση στις γενικές της γραμμές επιτευχθεί και γίνεται όλο και περισσότερο ισχυρή και αδιατάρακτη. Το εξειδικευμένο τμήμα αυτής της γενικής νέας σύνθεσης που αφορά τα αντιοξειδωτικά και την φυσιοπαθολογία των ανωτέρων θηλαστικών θα μπορούσε να βασιστεί σε έναν αριθμό κανόνων, η παράθεση των οποίων ξεφεύγει από το πλαίσιο αυτής της διατριβής, ωστόσο σε ό,τι αφορά μερικά από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του φαινομένου του καρκίνου μπορούμε να πούμε τα παρακάτω:

1^ο) Τα αντιοξειδωτικά μόρια κατέχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες αναστέλλοντας την δραστηριότητα των ποικίλων ισοενζυμικών μορφών της κυκλοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης.

2^ο) Τα αντιοξειδωτικά μόρια κατέχουν αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες αναστέλλοντας επίσης την κυκλοξυγονάση, την συνθετάση της θρομβοξάνης A_2 και την λιποξυγονάση.

3^ο) Τα αντιοξειδωτικά μόρια κατέχουν αντικαρκινογόνες ιδιότητες, όσον αφορά την χημική καρκινογένεση, εκκαθαρίζοντας τις ελεύθερες ρίζες

και τα ενεργά μόρια που παράγονται από το κυτόχρωμα P-450, καθώς και τα ενεργοποιημένα χημικά καρκινογόνα, αλλά και επιβραδύνοντας τον ρυθμό λειτουργίας αυτού καθαυτού του κυτοχρώμου P-450.

Βάσει αυτής της σύνθεσης και εμβαθύνοντας τον προβληματισμό στο φαινόμενο του καρκίνου, θα μπορούσε κανείς να διαβλέψει θεωρητικά ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια θα ήσαν σε θέση να λειτουργήσουν και ως εξής:

A) Να δράσουν ως αμιγείς αντικαρκινικοί (κυτταροτοξικοί) παράγοντες, αναστέλλοντας τα ένζυμα της φλεγμονής που υπάρχουν στα νεοπλασματικά κύτταρα, με έμφαση στις λιποξυγονάσες και κυκλοξυγονάσες.

B) Να παρεμποδίσουν την μεταστατική διασπορά τόσο διεγείροντας την κυτταροτοξική ικανότητα των λεμφοκυττάρων NK, όσο και αναστέλλοντας τις αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίων και νεοπλασματικών κυττάρων μέσω αναστολής της παραγωγής θρομβοξανίων και γενικότερα των προσταγλανδινών.

Όλη αυτή η θεωρητική λογική βρήκε πεδίο εφαρμογής στην μελέτη των βιολογικών δράσεων των εκχυλισμάτων *Viscum album* + *Abies alba* στα μοντέλα του καρκίνου που χρησιμοποιήσαμε.

Όπως δείξαμε παραπάνω τα εκχυλίσματα λειτούργησαν ως ισχυροί αμιγείς κυτταροτοξικοί παράγοντες τόσο στα *in vitro*, όσο και στα *in vivo* χρησιμοποιηθέντα μοντέλα καρκίνου, ενώ από την άλλη πλευρά η κυτταροτοξικότητά τους επί των ζώων, έδειξε και την παρεμβολή ενός επιπρόσθετου μηχανισμού σχετιζόμενου πιθανώς με την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον των νεοπλασματικών κυττάρων των όγκων.

Αποδείχτηκε επίσης με την χρήση του μοντέλου των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων του ανθρώπου, ότι τουλάχιστον ένα μέρος της ενδυνάμωσης του ανοσοποιητικού συστήματος σχετιζόταν με την αύξηση της κυτταροτοξικής ικανότητας των φονικών λεμφοκυττάρων εναντίον των καρκινικών κυττάρων.

Επίσης αποδείχτηκε ότι το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών εμφάνιζε υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, μετρημένη με ένα έγκυρο test και ότι άλλα αντιοξειδωτικά, όπως επίσης και εξειδικευμένοι spin traps ήσαν σε θέση να

ενισχύσουν την κυτταροτοξική ικανότητα των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων. Βάσει αυτών των συσχετισμών, τουλάχιστον σε πρώτο επίπεδο, αποδώσαμε την αύξηση της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων NK τουλάχιστον στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μικτού εκχυλίσματος.

Μέσα στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε στο πλαίσιο αυτής της διατριβής, υπήρξε και ένα πείραμα αναστολής ή τροποποίησης της καρκινογόνου δράσης του B[a]P σε επίμυες Wistar, ακολουθώντας το κλασικό μοντέλο της καρκινογένεσης που περιγράψαμε στο κεφάλαιο των «Υλικών και Μεθόδων». Εδώ η μέθοδος αναστολής αντιπροσωπεύτηκε κατά κύριο λόγο από την 24ωρη επώαση του B[a]P με μια μεγάλη ποσότητα ξηρανθέντος εκχυλίσματος που διαλύθηκε στον ίδιο διαλύτη με το καρκινογόνο και κατόπιν ενέθηκε στα πειραματόζωα.

Το πείραμα αυτό είχε θετική έκβαση και έδειξε ότι το εκχύλισμα των δύο φυτών εμπεριέχει μόρια που αναστέλλουν σε σημαντικό ποσοστό την δράση του καρκινογόνου, υποδεικνύοντας τα εξής ενδεχόμενα:

- α)** την χημική αντίδραση του B[a]P με κάποια συστατικά του εκχυλίσματος, έτσι ώστε να καταστραφούν τα μοριακά χαρακτηριστικά του B[a]P που ευθύνονται για την καρκινογόνα του δράση.
- β)** την αναστολή του κυτοχρώμου P – 450 στο περιβάλλον των ιστών στους οποίους εγχύθηκε το καρκινογόνο.
- γ)** την εκκαθάριση πολλών ελεύθερων ριζών που παρήχθησαν από τον μεταβολισμό του B[a]P και ήσαν σημαντικές τόσο για την φάση της έναρξης, όσο και για την φάση της προαγωγής.
- δ)** την πιθανότητα μεσοπρόθεσμης – μακροπρόθεσμης αντικαρκινικής δράσης του εκχυλίσματος του φυτού που ενέσαμε μαζί με το καρκινογόνο, ούτως ώστε να φονευθούν από τα συστατικά του εκχυλίσματος τόσο τα αρχικά νεοπλασματικά κύτταρα που παρήχθησαν, όσο και μέσω διέγερσης των λεμφοκυττάρων NK του ζώου, τα οποία ενδεχομένως προστατεύτηκαν από τις φυτικές ουσίες και παρέμειναν υψηλά λειτουργικά.

Ανεξάρτητα από τις εν λόγω υποθέσεις εμείς καταγράψαμε μια ουσιαστική αναστολή της καρκινογένεσης, πράγμα το οποίο εκφράστηκε τόσο στην μείωση της εμφάνισης κακοήθων όγκων στην ομάδα πρόληψης, όσο και

από την καθυστέρηση της εμφάνισης των όγκων στην ίδια ομάδα, αλλά και την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των μελών της σε σχέση με τις αντίστοιχες παραμέτρους της ομάδας ελέγχου.

Σε όλες τις περιπτώσεις το εκχύλισμα έδωσε και αντικαρκινογόνο αποτέλεσμα, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά που περιείχε είχαν την δυνατότητα να δράσουν κατ' αυτόν τον συγκεκριμένο τρόπο.

Από την άλλη πλευρά δείξαμε ότι το μικτό φυτικό εκχύλισμα ήταν σε θέση να αναστείλει δόσοεξαρτώμενα την αντίδραση της λιποξυγονάσης σε ένα *in vitro* μοντέλο αυτής. Δεδομένου ότι οι αναστολείς των λιποξυγονασών, όπως επίσης και των κυκλοξυγονασών εισάγουν σαφή κυτταροτοξικά φαινόμενα σε πολλές σειρές νεοπλασματικών κυττάρων *in vitro* μπορούμε να δεχθούμε ότι η αμιγής κυτταροτοξικότητα του μικτού εκχυλίσματος εναντίον των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων στο τρυβλίο, οφείλεται στην ιδιότητα αυτού να λειτουργεί ως αναστολέας της λιποξυγονάσης. Δεδομένου επίσης ότι διάφορα αντιοξειδωτικά μόρια αναστέλλουν δόσοεξαρτώμενα την λιποξυγονάση μπορούμε να δεχθούμε ότι η αναστολή αυτής εκ μέρους του εκχυλίσματος οφείλεται στην υψηλή ολική αντιοξειδωτική του ισχύ.

Ο βρασμός του εκχυλίσματος επί 30 λεπτά της ώρας μειώνει μεν αλλά δεν καταργεί απολύτως την ανασταλτική δράση αυτού επί της λιποξυγονάσης, ενώ η οξειδωσή του με την χρησιμοποίηση υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει ένα περίεργο αποτέλεσμα βάσει του οποίου δεν είμαστε σε θέση να εκτιμήσουμε αν η οξειδωση δημιουργεί πλήρη αδρανοποίηση του εκχυλίσματος απέναντι στην λιποξυγονάση, καθόσον τα οξειδωμένα εκχυλίσματα έχουν την τάση να οξειδώνουν άμεσα το υπόστρωμα του εν λόγω ενζύμου (το λινελαϊκό οξύ), οπότε δεν μπορούμε να εκκινήσουμε την αντίδραση.

Η μελέτη μας δείχνει ότι όντως το εκχύλισμα των δύο φυτών αναστέλλει δόσοεξαρτώμενα την λιποξυγονάση και μάλιστα η ποσότητα του εκχυλίσματος που προκαλεί πλήρη αναστολή είναι ίση προς 0,18 mg / ml αντιδρώντος διαλύματος. Ο θάνατος των νεοπλασματικών κυττάρων στο *in vitro* μοντέλο που μελετήσαμε αρχίζει να εκδηλώνεται ήδη από ποσότητες μικρότερες των 0,16 mg μικτού εκχυλίσματος ανά ml εναιωρήματος λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, ενώ η IC₅₀ του μικτού εκχυλίσματος, για την

ίδια κυτταρική σειρά, είναι ίση προς 0,16 mg / ml στις 24 ώρες και 0,5 mg / ml στις 48 ώρες.

Η ελάχιστη θανατηφόρα δόση (MLC) του μικτού εκχυλίσματος είναι λίγο μεγαλύτερη από 1,66 mg / ml εναιωρήματος νεοπλασματικών κυττάρων, δηλαδή περίπου δεκαπλάσια από εκείνη η οποία προκαλεί πλήρη αναστολή στην καθαρή εν διαλύσει λιποξυγονάση. Αν δηλαδή ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων οφειλόταν εξ ολοκλήρου σε μια πλήρη αναστολή της εσωτερικής τους λιποξυγονάσης, τότε οι ελάχιστες χρησιμοποιηθείσες ποσότητες εκχυλίσματος που προκαλούν ολικό θάνατο στον πληθυσμό του τρυβλίου αντιστοιχούν πολύ καλά στις δόσεις που προκαλούν ολική αναστολή της λιποξυγονάσης *in vitro*.

Δεδομένου ότι το εκχύλισμα περιέχει πολλές ουσίες είναι απολύτως λογικό η συνολική του ποσότητα να είναι μεγαλύτερη από την ποσότητα εκείνης της ουσίας που θα προκαλούσε πλήρη αναστολή της λιποξυγονάσης. Συνεπώς μέσα στα 0,18 mg εκχυλίσματος εμπεριέχεται η ποσότητα της ουσίας που προκαλεί πλήρη αναστολή του ενζύμου, εκτός και αν δεν πρόκειται για μια μόνον ουσία, αλλά ένα σύνολο ουσιών με αθροιστική ή συνεργική δράση.

Προφανώς είναι πιο εύκολη η αναστολή του ενζύμου όταν αυτό είναι ελεύθερο σε ένα διάλυμα, σε σύγκριση με την αναστολή του όταν είναι προστατευμένο στο εσωτερικό ενός κυττάρου, οπότε το (ή τα) ανασταλτικό μόριο για να το συναντήσει πρέπει να περάσει τόσο από τις μεμβράνες όσο και από τις υπόλοιπες κυτταροπλασματικές δομές, πράγμα που επιβάλλει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναστολέα. Η όλη ανάλυση φαίνεται να είναι ιδιαίτερος ευνοϊκή και υποστηριζόμενη πειστικά από τα υπάρχοντα δεδομένα.

Τα ανωτέρω δεδομένα είναι αξιόλογα όσον αφορά την ερμηνεία των πειραματικών μας αποτελεσμάτων, καθόσον αποδεικνύουν ότι υπάρχει μια σοβαρή ευθυγράμμιση των συγκεντρώσεων στις οποίες λαμβάνουν χώρα τα αμιγή *in vitro* κυτταροτοξικά φαινόμενα και ταυτοχρόνως η αναστολή της λιποξυγονάσης.

Όσο πιο πέραν αυτών των αξιόλογων δεδομένων υπάρχουν και άλλα σημαντικά δεδομένα τα οποία εξάγονται από τα πειράματα τα σχετικά με τα αιμοπετάλια και την συσσώρευσή τους εκ μέρους των λειομυοσαρκοματικών κυττάρων.

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε ένα μοντέλο της αιματογενούς μεταστατικής διασποράς που βασίζοταν στην συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων *ex vivo* μέσω χορήγησης συγκεκριμένων ποσοτήτων λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμυος.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια του ξενιστή καθόσον παράγουν τουλάχιστον σε υψηλές ποσότητες προστανοειδή μόρια, όπως η θρομβοξάνη A_2 (TXA_2) και η προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2).

Τα αιμοπετάλια που έχουν ενεργοποιηθεί συσσωρεύονται με κέντρο το συσσωμάτωμα των νεοπλασματικών κυττάρων, καλύπτοντας απολύτως τα κακοήγη κύτταρα, που κατά τον τρόπο αυτό ξεφεύγουν από την επιτήρηση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τελικά ο μικτός αυτός θρόμβος σταματά στο δίκτυο των τριχοειδών, όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν πλέον όλο τον χρόνο να διηθήσουν το αιμοπεταλιακό περιτύλιγμα, να εισχωρήσουν στον ιστό, να φωλιάσουν εκεί και να αρχίσουν τον πολλαπλασιασμό τους που θα δώσει γένεση σε μια μεταστατική αποικία.

Αν τα αιμοπετάλια δεν αντιδράσουν με τα κυκλοφορούντα νεοπλασματικά κύτταρα (που συχνά αποτελούν συσσωματώματα πολλών χιλιάδων), τότε αυτά θα παραμένουν συνεχώς στο εσωτερικό του αιματικού ποταμού, οπότε είναι δυνατόν να εντοπισθούν και να καταστραφούν από το ανοσοποιητικό σύστημα, ή από τις μηχανικές καταπονήσεις της κυκλοφορίας, καθόσον δεν είναι κύτταρα εξειδικευμένα για διαδρομές εντός των αγγείων.

Τα αντιπηκτικά όπως επίσης και τα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα έχουν μια θέση στην πρόληψη των μεταστάσεων, πράγμα το οποίο δεν έχει αξιολογηθεί δεόντως από την ιατρική παγκόσμια κοινότητα, αν και οι σχετικές μελέτες δεν είναι ευκαταφρόνητες σε αριθμό, αλλά και σε ενθαρρυντικά δεδομένα. Οι πρώτες παρατηρήσεις μάλιστα είναι αρκετά παλιές και έγιναν από τον Terranova γύρω στο μέσον της δεκαετίας του '50.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματά μας δείχνουν ότι οι ποσότητες της TXA_2 και της PGE_2 που εμπεριέχονται στα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα είναι πολύ υψηλές (>3000 pg / ml κυτταρικού κατακρημνίσματος) και είναι σε θέση να προκαλέσουν ισχυρή συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου.

Η χορήγηση ινδομεθακίνης αποτρέπει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων εκ μέρους των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η παραγωγή των εν λόγω δύο προστανοειδών οφείλεται σε ένζυμα του τύπου της κυκλοξυγονάσης.

Η χορήγηση επίσης ποσότητας εκχυλίσματος των δύο φυτών περιεχομένου μεταξύ των 4 και 10 mg / ml PRP είναι σε θέση να αναστείλει πλήρως την αιμοπεταλιακή συσσώρευση εκ μέρους των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι το εκχύλισμα έχει αξιολογες αντιαιμοπεταλιακές ιδιότητες και μάλιστα σε μια περιοχή δόσεων που κείται μέσα στο διάστημα των δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν στους *in vivo* πειραματισμούς. Συνεπώς το εκχύλισμα των δύο φυτών έχει σαφείς αντιαιμοπεταλιακές και ενδεχομένως αντιμεταστατικές ιδιότητες, καθόσον αποτελεί έναν ισχυρό διεγέρτη και των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων ταυτοχρόνως.

Με την παράθεση όλων των ανωτέρω φαίνεται ότι τα βασικά επτά ερωτήματα τα οποία θέσαμε ως άξονα της συζήτησής των αποτελεσμάτων της εν λόγω διατριβής απαντώνται εξ ολοκλήρου ως εξής:

1^{ον}) Στην ερώτηση «Έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες τα δύο συνεργούντα φυτά *Viscum album* + *Abies alba* ;», η απάντηση είναι θετική: Τα δύο συνεργούντα φυτά έχουν σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες τόσο στα *in vitro* όσο και στα *in vivo* μοντέλα του καρκίνου. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες στο επίπεδο του τρυβλίου είναι άμεσα συνδεδεμένες με κυτταροτοξική δράση κατά των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες στο επίπεδο του πειραματόζωου φαίνεται ότι αποτελούν μια συνισταμένη άμεσων κυτταροτοξικών ιδιοτήτων, στρεφόμενων κυρίως κατά των καρκινικών κυττάρων και πολύ λιγότερο (ή καθόλου) κατά των φυσιολογικών, καθώς και έμμεσων κυτταροτοξικών δράσεων που ασκούνται επί των καρκινικών κυττάρων, τουλάχιστον, από τα λεμφοκύτταρα NK.

2^{ον}) Στην ερώτηση «Έχουν αντικαρκινογόνες ιδιότητες τα εκχυλίσματα των δύο φυτών;», επίσης η απάντηση είναι θετική: Το μικτό φυτικό εκχύλισμα εμφανίζει σημαντικές αντικαρκινογόνες ιδιότητες, μειώνοντας το ποσοστό της

χημικής καρκινογένεσης, τόσο υπό την μορφή επαγωγής όγκων, αλλά και αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης.

3^{ον}) Στην ερώτηση αν τα εκχυλίσματα «Είναι σε θέση να επηρεάσουν την ανοσολογική απάντηση ενός οργανισμού;», η απάντηση είναι σαφώς καταφατική καθώς η χορήγηση μικρών ποσοτήτων μικτού εκχυλίσματος σε βραχύχρονες καλλιέργειες φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων του ανθρώπου αυξάνει την λειτουργική κυτταροτοξικότητα των εν λόγω ανοσοκυττάρων, εναντίον καρκινικών κυττάρων και μάλιστα σε ποσοστά που υπερβαίνουν, σε ορισμένες κυτταρικές αναλογίες λεμφοκυττάρων NK / προς κύτταρα στόχους, κατά πολύ το 100%.

4^{ον}) Στην ερώτηση αν τα εκχυλίσματα «Είναι σε θέση να επηρεάσουν την μεταστατική διασπορά και μέσω ποιου μηχανισμού;» η απάντηση είναι σαφώς καταφατική: σε δύο μοντέλα μετάστασης που πειραματιστήκαμε είχαμε αξιόλογη συμπίεση του ποσοστού των μεταστάσεων (*in vivo*), ενώ στο *in vitro* μοντέλο είχαμε πλήρη αναστολή της συσσωρευτικής ικανότητας των νεοπλασματικών κυττάρων επί των αιμοπεταλίων του ανθρώπου, μέσω της χορήγησης εκχυλίσματος και μάλιστα στο πλαίσιο των δόσεων εντός των οποίων στα *in vitro* πειράματα καταγράψαμε πολύ υψηλή κυτταροτοξικότητα. Η αναστολή της παραγωγής TXA_2 και PGE_2 , δηλαδή η ικανότητά του να αναστέλλει την κυκλοξυγονάση, όπως και την λιποξυγονάση, υποδεικνύει έναν μηχανισμό δράσης που μοιάζει με εκείνον των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

5^{ον}) Στην ερώτηση αν τα εκχυλίσματα «Διαθέτουν κάποιο θεμελιώδες χημικό χαρακτηριστικό το οποίο να δικαιολογεί κατά βάση τις όποιες βιολογικές τους δράσεις κατά του καρκίνου;» μπορεί κανείς να αναφέρει την υψηλή αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία μπορεί να συνδέει μεταξύ τους όλα αυτά τα ετερογενή φαινόμενα, εξ αιτίας της ύπαρξης συγκλίσεων στους μηχανισμούς επί των οποίων στηρίζονται, δηλαδή την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

6^{ον}) Στην ερώτηση αν τα εκχυλίσματα των δύο φυτών «Τροποποιούν κάποιον θεμελιώδη μεταβολισμό ο οποίος ευθύνεται για μια πλειάδα φαινομένων συνδεδεμένων στενά στο πλαίσιο της οντότητας του καρκινικού κυττάρου και του οργανισμού που αποτελεί τον φορέα και ξενιστή του;», η απάντηση είναι επίσης καταφατική: τα εκχυλίσματα τροποποιούν οπωσδήποτε τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, ο ρόλος του οποίου είναι σημαντικός για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και η αναστολή του σχετίζεται στενά με την θανάτωσή τους.

7^{ον}) Στην ερώτηση «Ποια μέρη των δύο φυτών περιέχουν τα βιολογικά δραστικά συστατικά;» η απάντηση είναι σαφής: Στο μεν *Viscum album* τα ενεργά συστατικά υπάρχουν σαφώς στα φύλλα, τους πράσινους βλαστούς και στους καρπούς. Στο *Abies alba* τα ενεργά συστατικά απαντώνται επίσης στα φύλλα, στον πράσινο φωτοσυνθετικό φλοιό και λιγότερο στα ξυλώδη μέρη, από τα οποία ωστόσο δεν λείπουν εντελώς. Οι ιστοί της συνέργιας των δύο φυτών περιέχουν ένα ποσοστό ουσιών ενδιάμεσης συγκέντρωσης μεταξύ εκείνη του ξύλου, και των πράσινων φωτοσυνθετικών τμημάτων των φυτών.

Από όλα τα ανωτέρω εκτεθέντα προκύπτει ότι το εκχύλισμα των δύο φυτών εμφανίζει σημαντικές ιδιότητες κατά του καρκίνου σε πολλά επίπεδα της νεοπλασματικής νόσου.

Είναι πολύ πιθανόν η βασική χημική ιδιότητα που αφορά τις εν λόγω δράσεις να σχετίζεται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μοριακών συστατικών αυτού. Είναι απαραίτητη συνεπώς η περαιτέρω εμβάθυνση της μελέτης σε επίπεδο μορίων, εφ' όσον γίνει απομόνωση των διαφόρων συστατικών του εκχυλίσματος.

Η αναλυτική εκτίμηση των βιολογικών ιδιοτήτων των μοριακών του συστατικών φαίνεται να υπόσχεται την ανάπτυξη νέων και σημαντικά ισχυρών θεραπευτικών εργαλείων για την αντιμετώπιση του καρκίνου στο πειραματικό, αλλά κυρίως στο κλινικό επίπεδο. Φάρμακα περιέχοντα κάποια από τα ενεργά συστατικά του *Viscum album* έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο από το 1984, αλλά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι όχι μόνον το επίφυτο αλλά και οι ξενιστές περιέχουν σημαντικές ουσίες με πολλαπλές δράσεις κατά του καρκίνου.

Είναι επίσης πολύ σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι τα εκχυλίσματα των δύο φυτών που μελετήθηκαν έχουν και αντικαρκινογόνες ιδιότητες οπότε μπορούν κατ' αρχάς να χρησιμοποιηθούν και ως προληπτικά ή και μεταφυλακτικά μέσα κατά του καρκίνου. Αν όλες αυτές οι ιδιότητες είναι συνάρτηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των εν λόγω συστατικών μπορεί να απαντηθεί όταν τα επί μέρους μόρια απομονωθούν και μελετηθούν χημικά και βιολογικά.

Κατά την γνώμη μας η περιεκτικότητα των δραστικών συστατικών φαίνεται ότι μεταβάλλεται περιοδικά κατά την διάρκεια των τεσσάρων εποχών του έτους, με την υψηλότερη συγκέντρωση να επιτυγχάνεται, στους προαναφερθέντες ιστούς των δύο φυτών, μεταξύ του τέλους του καλοκαιριού και των πρώτων ημερών του χειμώνα. Επίσης το τοπικό οικοσύστημα φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα των φυτών σε ενεργά συστατικά, όπως επίσης και οι εδαφολογικές – κλιματολογικές συνθήκες.

Οι περιεκτικότητες αλλά και η φύση των συστατικών του συστήματος ξενιστής – επίφυτο, οπωσδήποτε σχετίζονται στενά με τον ξενιστή, ο οποίος φαίνεται ότι είναι σε θέση να επηρεάσει την βιολογία του επίφυτου. Η ύπαρξη επίσης και του αντιθέτου feedback, από το επίφυτο στον ξενιστή, έχει επίσης καταγραφεί. Πολύ χαρακτηριστικά, ένα από τα εντυπωσιακότερα φυτολογικά ευρήματα αυτής της διατριβής υπήρξε η διαπίστωση ότι το *Viscum album* που φύεται επί της δρυός (*Quercus*) συμπεριφέρεται ως φυλλοβόλο, ενώ εκείνο που φύεται επί του *Abies* έχει συμπεριφορά αιθαλούς, ακολουθώντας δηλαδή τον τύπο διαχείρισης του φυλλώματος του ξενιστή.

Όσον αφορά τα Ελληνικά οικοσυστήματα φαίνεται ότι το *Viscum album* διαθέτει μια σχετική αφθονία, αν και η μελέτη των φαρμακολογικών δράσεων των γηγενών ποικιλιών είναι απελπιστικά ισχνή, σε σύγκριση με την αφθονία του εν λόγω είδους και την ισχυρότητα των δράσεών του.

Μια προαγωγή αυτής της μελέτης, όπως και γενικά αυτών των τύπων μελετών, είναι σε θέση να δημιουργήσει ήπια και αποτελεσματικά όπλα για την αντιμετώπιση του καρκίνου, καθώς την προφύλαξη και την μεταφύλαξη από την δύσκολη αυτή νόσο.

Αν και η διατριβή μας ουσιαστικά χρηματοδοτήθηκε «εκ των ενόντων», εν τούτοις πιστεύουμε ότι το αποτέλεσμα υπήρξε αξιοπρεπές.

Η μελέτη αυτή θα συνεχιστεί σε ένα μεταδιδακτορικό ερευνητικό επίπεδο, παρά τις όποιες δυσκολίες, με σκοπό την εμβάθυνση των αποτελεσμάτων της και την προσπόριση καινούργιων ουσιών για την θεραπεία και την διαχείριση του καρκίνου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ, ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Abies alba* ΚΑΙ *Viscum album subsp. abietis* ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΚΟΗΘΩΝ ΣΑΡΚΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

Ιωάννης Π. Ζελοβίτης

**Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
45110, Ελλάδα**

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε τις βιολογικές δράσεις ενός μικτού εκχυλίσματος δύο συνεργούντων φυτών (*Viscum album* + *Abies alba*) σε μια σειρά *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* μοντέλων του καρκίνου, χρησιμοποιώντας πάντοτε ως πρώτη ύλη εξαγωγής τους ιστούς συνεργούντων φυτών.

Οι σχετικές εσοδείες έγιναν κατά όλες τις εποχές του έτους, όπως επίσης και οι εκχυλίσεις. Ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιήσαμε στις περισσότερες περιπτώσεις την αιθυλική αλκοόλη, ενώ σε λιγότερες περιπτώσεις το υποζέον νερό (95 ° C) σε συνδυασμό με την λειοφυλίωση.

Οι νεοπλασματικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τα *in vitro* πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικότητας όλων των ιστικών εκχυλισμάτων και των συνδυασμών τους ήσαν μια σειρά λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμυος *Wistar* που δημιουργήθηκε για τον σκοπό αυτό στο Εργαστήριό μας, καθώς και η λευχαιμική σειρά L-210. Επίσης χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων NK η ερυθρολευχαιμική σειρά K-562.

Τα εκχυλίσματα φυτικών ιστών που μελετήθηκαν ήσαν: εκχυλίσματα φύλλων, βλαστών και καρπών για το *Viscum album* και εκχυλίσματα φύλλων, πράσινου φλοιού και ξύλου για το *Abies alba*. Ακόμη μελετήθηκε το εκχύλισμα της συνέργιας των δύο φυτών. Τέλος μελετήθηκε ένα μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών, τόσο ως προς την κυτταροτοξικότητά του *in vitro*, όσο και προς τις αντικαρκινικές και αντικαρκινογόνες του ιδιότητες *in vivo*.

Ακόμη μελετήθηκε η δράση του εν λόγω μικτού εκχυλίσματος επί της κυτταροτοξικής ικανότητας των φυσικών φονικών λεμφοκυττάρων του ανθρώπου, εναντίον νεοπλασματικών κυττάρων της ανθρώπινης σειράς K-562 και λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμυος *Wistar*.

Επί πλέον μελετήθηκε η αντιμεταστατική δράση του μικτού εκχυλίσματος σε ένα *in vivo* μοντέλο μετάστασης, στο οποίο έγινε ενδοφλέβια έγχυση μεγάλων αριθμών λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, ενώ εκ παραλλήλου μελετήθηκε η αντιμεταστατική δράση του εν λόγω εκχυλίσματος σε ένα *in vitro* μοντέλο της αιματογενούς μεταστατικής διασποράς περιλαμβάνον τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ νεοπλασματικών κυττάρων και αιμοπεταλίων.

Επίσης μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του μικτού εκχυλίσματος, η ικανότητα αναστολής του ενζύμου 5-λιποξυγονάση, η ικανότητα αναστολής της παραγωγής θρομβοξάνης A₂ και προσταγλανδίνης E₂ από ανθρώπινα αιμοπετάλια, όπως και από καρκινικά κύτταρα.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από το σύνολο της μελέτης μας δείχνουν ότι:

1^{ον}) Όλα τα εκχυλίσματα των χρησιμοποιηθέντων ιστών των δύο φυτών εμφανίζουν κυτταροτοξικές ιδιότητες εναντίον των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων του επίμυος *Wistar in vitro*.

2^{ον}) Το μικτό εκχύλισμα των δύο φυτών είναι επίσης ισχυρά κυτταροτοξικό απέναντι στην προαναφερθείσα καρκινική σειρά.

3^{ον}) Το μικτό εκχύλισμα είναι ισχυρά κυτταροτοξικό απέναντι των νεοπλασματικών κυττάρων των όγκων που αναπτύσσονται σε επίμυες *Wistar* είτε μέσω ενοφθαλμισμού λειομυοσαρκωματικών κυττάρων, είτε μέσω έγχυσης 3,4 – βενζοπυρενίου. Οι κυτταροτοξικότητες του εκχυλίσματος είναι διαφορετικές στα δύο μοντέλα καρκίνου, εμφανιζόμενες ισχυρότερες επί των ζώων που κατέστησαν καρκινοπαθή μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων, ενώ είναι μικρότερες επί των ζώων που κατέστησαν καρκινοπαθή μέσω χημικής καρκινογένεσης δια βενζοπυρενίου.

4^{ον}) Το μικτό εκχύλισμα είναι αντικαρκινογόνο καθόσον αναστέλλει σημαντικά την καρκινογόνο δράση του B[a]P, μειώνοντας το ποσοστό εμφάνισης

κακοήθων όγκων, αλλά και αυξάνοντας το προσδόκιμο επιβίωσης των καρκινοπαθών ζώων, εν συγκρίσει προς τους μάρτυρες.

5^{ον}) Το εν λόγω εκχύλισμα ενισχύει την κυτταροτοξική δράση των λεμφοκυττάρων NK του ανθρώπου εναντίον καρκινικών κυττάρων K-562 και λειομυοσαρκωματικών κυττάρων ως στόχων.

6^{ον}) Το μικτό εκχύλισμα αναστέλλει επίσης την μεταστατική διαδικασία (αιματογενής διασπορά) στο *in vivo* μοντέλο μετάστασης που μελετήσαμε στον επίμυ Wistar, αλλά και στο *in vitro* μοντέλο το σχετικό με την συσσωρευτική δράση των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επί των αιμοπεταλίων του ανθρώπου.

7^{ον}) Το μικτό εκχύλισμα αναστέλλει δοσοεξαρτώμενα την 5-λιποξυγονάση, σε *in vitro* χημική αντίδραση, απουσία κυτταρικού περιβάλλοντος, όπως επίσης και την κυκλοξυγονάση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων και των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων *ex vivo* και *in vitro* αντιστοίχως.

8^{ον}) Το εν λόγω εκχύλισμα παρουσιάζει αξιόλογη ολική αντιοξειδωτική ισχύ, η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό πολλών ουσιών, συνθετικών ή φυσικών, οι οποίες είναι προικισμένες με ανάλογες αντικαρκινικές, αντικαρκινογόνες, όπως επίσης αντιαιμοπεταλιακές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες.

9^{ον}) Τέλος το μικτό εκχύλισμα διαθέτει πολύ χαμηλή έως καθόλου χρόνια τοξικότητα ακόμη και σε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε συγκεντρώσεις υπερδιπλάσιες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν θεραπευτικά στους επίμυες.

Βεβαίως αυτό δεν μπορεί να ερμηνεύσει τις εν λόγω βιολογικές ιδιότητες του μικτού εκχυλίσματος των δύο φυτών, καθόσον η πληθώρα των μικρών μορίων μπορεί να εμπεριέχει ουσίες ικανές να αναστέλλουν ή να τροποποιούν κατά εξειδικευμένο τρόπο, μη σχετιζόμενο με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, σημαντικούς μεταβολισμούς, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων. Είναι απαραίτητη η πλήρης χημική ανάλυση και η επί μέρους μελέτη των ενεργών συστατικών των δύο φυτών, προκειμένου να εντοπιστούν οι μοριακοί τελεστές όλων των φαινομένων που περιγράφηκαν στην διατριβή μας.

Ανεξάρτητα από τα παραπάνω, τα εκχύλισματα των δύο φυτών (*Viscum album* και *Abies alba*) που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, με

τις σημαντικές αντικαρκινικές, αντιμεταστατικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες καθώς και την πολύ χαμηλή τοξικότητά τους, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα σημαντικό υποψήφιο για την αγωγή των κακοηθών νόσων ζώων και ανθρώπων.

SUMMARY

ISOLATION OF ACTIVE EXTRACTS AND FRACTIONS OF PLANTS *Abies alba* AND *Viscum album subsp. abietis* AND STUDIES OF THEIR EFFECTS ON PROLIFERATION OF MALIGNANT SARCOMA CELLS AND SARCOMA BEARING WISTAR RATS.

Ioannis P. Zelovitis

**Laboratory of Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina,
45110, Greece**

In the present dissertation the biological effects of a mixture extract of two plants (*Viscum album* and *Abies alba*) with synergistic actions, were studied in vitro, in vivo and ex vivo malignant sarcoma cells and sarcoma bearing animals.

Harvesting of the plants was performed all seasons, as well as extracts of plants' tissues. Ethylic alcohol was used as extract medium in most cases and boiling water (95 °C) in the rest, in combination with leiophiliosis. A leiomyosarcoma cell line isolated Grown tumors of Wistar rat and the leukemic cell line L-210, were used for estimation of cytotoxic effects of all extracts. The erythroleukemic cell line K-562 was used for estimation of cytotoxicity of NK lymphocytes. The extracts of plants' tissues studied were: extracts of leaves, blastus and fruits from *Viscum album* and extracts of green leaves, green phloem and wood from *Abies alba*. A mixture extract of both plants was also studied for its cytotoxic effects in vitro, as well as its anticancer and anticarcinogenic effects, in vivo.

The mixture extract was also studied for the enhancement of the cytotoxic activity of natural killers (NKs) lymphocytes against the human erythroleukemic line K-562 and the leiomyosarcoma cell line of Wistar rats.

Furthermore the antimetastatic effects of the mixture extract was studied on an in vivo model of metastasis by administration of a great number of leiomyosarcoma cells in Wistar rats, and by testing its ability to inhibit human platelet aggregation induced by leiomyosarcoma cells.

Total oxidant capacity of the mixture extract, the ability to inhibit lipoxygenase in vitro, as well as to inhibit the production of thromboxane A₂ and prostaglandin E₂ from human platelets and malignant cells, were also studied.

Results of the present study indicate that:

1st) All plant tissues extracts used exert cytotoxic effects on leiomyosarcoma cell lines (LMS) in vitro.

2nd) The mixture extract of both plants exerts also potent cytotoxic effects on LMS, in vitro.

3rd) Potent cytotoxic effects against leiomyosarcoma tumors induced either by inoculation of LMS or by injection of benzo(a)pyrene in Wistar rats, were also exerted by the plant extract mixture. Cytotoxic effects of plants' mixture extract were found more potent in Wistar rats bearing tumors induced by cell inoculation than tumors induced by injection of B(a)P.

4th) The plants mixture extract exerts its anticarcinogenic effect inhibiting significantly the carcinogenic potency of B(a)P, decreasing tumor induction, and prolonging survival of Wistar rats.

5th) The plants' mixed extract enhances significantly the cytotoxic effects of NKs against K-562 erythroleukemic cells as well as against LMS target cells.

6th) Antimetastatic effects of the mixed extract were confirmed by its ability to inhibit the in vivo model studied, as well as the inhibition of leiomyosarcoma cells induced human platelet aggregation.

7th) 5-lipoxygenase and cyclooxygenase were also inhibited human platelets and in LMS cells by the mixture extract of both plants.

8th) The mixed extract of both plants manifest also potent total antioxidant capacity (TAC).

9th) The mixed extract possesses also very low up to insignificant chronic toxicity as has been shown by administration of doses more than 2X, than those used therapeutically in Wistar rats.

In conclusion, the mixed extract of both plants possesses potent cytotoxic effects on LMS and tumor-bearing animals, significant antimetastatic actions, anti-inflammatory, antiplatelet and immune-enhancing effects, as well as remarkable total antioxidant capacity.

All the above mentioned cannot interpret completely the biological effects exerted by both plants, since their extracts contain a plethora of small molecules which may specifically modify and/or inhibit important metabolic pathways crucial for the survival and proliferation of malignant cells. Isolation of these molecules and further molecular studies may reveal underlying mechanism responsible for the effects described in the present study.

However, our results strongly indicate that extracts of both plants (*Viscum album* and *Abies alba*) possesses significant anticancer properties and very low toxicity and could in the near future to be an important candidates for the treatment of malignant diseases in animals and humans.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sheu J., Shih IeM. HLA-G and immune evasion in cancer cell. J. Formos Med Assoc. 2010, Apr. 109 (4) : 248 - 257.
2. Hess AD. Reconstruction of self-tolerance after hematopoietic stem cell transplantation. Immunol Res. 2010 Jul. 47 (1-3) : 143 - 152.
3. Rubin B. Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. Scand J Immunol. 2009 Mar. 69 (3) : 275 - 290.
4. Moretta A., Pende D., Locatelli F., Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high-risk leukaemias. Clin Exp Immunol. 2009 Sep. 157 (3) : 352 - 331.
5. Ringdén O., Karlsson H., Olsson R., Uhlin M. The allogenic graft versus cancer effect. Br. J. Haematol. 2009 Dec. 147 (5) : 614 - 633. Epub 2009 Sept 4.
6. Vojvodić S., Popović S. Natural killer cells-biology, functions and clinical relevance. Med Pregl. 2010 Jan-Feb. 63 (1-2) : 91 - 97.
7. Hess AD. Reconstitution of self-tolerance after hematopoietic stem cell transplantation. Immunol Res. 2010 Jul. 47 (1-3) : 143 - 152.
8. Murchison EP. Clonally trasmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. Oncogene. 2008 Dec. 27 Suppl 2 : S19 - 30.
9. Sioud M., Does our current understanding of immune tolerance, autoimmunity, and immunosuppressive mechanisms facilitate the design efficient cancer vaccines? Scand J Immunol. 2009 Dec. 70 (6) : 516 - 525.
10. Zhou F. Molecular mechanisms of viral immune evasion proteins to inhibit MHC class I antigen processing and presenation. Int Rev Immunol. 2009. 28 (5) : 376 - 393.

11. Karlsson H., Olsson R., Omazic B., Uhlin M., Ringdén O. The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br. J Haematol.* 2009 Dec. 147 (5) : 614 - 633. Epub 2009 Sep.4.
12. Moretta A., Pende D., Locatelli F., Moretta L. Activating and inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) in haploidentical haemopoietic stem cell transplantation to cure high risk leukaemias. *Clin Exp. Immunol.* 2009 Sep. 157 (3) : 325 - 331.
13. Rubin B. Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. *Scand J Immunol.* 2009 Mar. 69 (3) : 275 - 290.
14. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol.* 2009 Mar. 182 (6) : 3335 - 3341.
15. Srivastava S., Lundqvist A., Childs RW. Natural killer cells immunotherapy for cancer : a new hope. *Cytotherapy.* 2008.10 (8) : 775 - 783.
16. Riley JK., Yokoyama WM. NK cell tolerance and the maternal - fetal interface. *Am J Reprod Immunol.* 2008 May. 59 (5) : 371 - 378.
17. Zamanakou M., Germenis AE., Karanikas V. Tumour immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett.* 2007 Aug 15. 111 (2) : 69 - 75. Epub 2007 Jul 2.
18. Huang J., Klionsky DJ. Autophagy and human disease. *Cell Cycle.* 2007 Aug. 1. 6 (15) : 1837 - 1849. Epub 2007 May 25.
19. Sheu JJ., Shih IeM. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol.* 2007 Dec. 17 (6) : 4366 - 443. Epub 2007 Jul 3.
20. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007 May. 121 (1) : 1-14. Epub 2007 Mar 26.

21. Seliger B. Strategies of tumour immune evasion. *Bio Drugs*. 2005. 19 (6) : 347 - 354.
22. Alfred Lehninger. *Biochemica*. Ed Zannichelli. Italia 1984.
23. Shanmugam M, McBrayer SK, Rosen ST. Targeting the Warburg effect in haematological malignancies: from PET to therapy. *Curr Opin Oncol*. 2009 Nov. 21 (6) : 531 – 536.
24. Formentini L., Martinez-Reyes I., Cuezva JM., The mitochondrial bioenergetics capacity of carcinomas. *IUBMB Life*. 2010 Jul. 62 (7) : 554 – 560.
25. Ben Sahra I., Le Marchand-Brustel Y., Tanti JF., Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther*. 2010 May. 9 (5) : Epub 2010 May 4.
26. Cohen S., Flescher E. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry*. 2009 Sep. 70 (13-14) : 1600 – 1609. Epub 2009 Aug 5.
27. Harguindey S., Arranz JL., Wahl ML., Orive G., Reshkin SJ., Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res*. 2009 Jun. 29 (6) : 2127 – 2136.
28. Cuezva JM., Ortega AD., Willers I., Sánchez-Cenizo L., Aldea M., Sánchez-Aragó M. The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec. 1792 (12) : 1145 – 1158. Epub 2009 Jan 23.
29. Scatena R., Bottoni P., Pontoglio A., Mastrototaro L., Giardina B. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investing Drugs*. 2008 Oct. 17 (10) : 1533 – 1545.
30. Goldin N., Heyfets A., Reischer D., Flescher E. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the jasmonate family. *J. Bioenerg Biomembr*. 2007 Feb. 39 (1) : 51 – 57.

31. Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006 Sep. 9 (5) : 535 – 539.
32. Flescher E. Jasmonates in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2007 Jan 8. 245 (1-2) : 1 – 10. Epub 2006 Apr 4.
33. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005. 39 : 359 – 407.
34. Harguindey S., Orive G., Luis Pedraz J., Paradiso A., Reshkin SJ. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin – one single nature. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Sep 25. 1756 (1) : 1 – 24.
35. Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol*. 2001 Sep. 36 (9) : 1539 – 1550.
36. Dorward A., Sweet S., Moorhead R., Singh G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: redox balance, cell cycle, and drug resistance. *J. Bioenerg Biomembr*. 1997 Aug. 29 (4) : 385 – 392.
37. Argilés JM., Azcón-Bieto J. The metabolic environment of cancer. *Mol Cell Biochem*. 1988 May. 81 (1) : 3 – 17.
38. Ferreira LM. Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Exp Mol Pathol*. 2010 Dec. 89 (3) : 372 – 380. Epub 2010 Sep 8.
39. Berridge MV., Herst PM., Tan AS. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. *Mitochondrion*. 2010 Nov. 10 (6) : 584 – 588. Epub 2010 Aug 10.
40. Del Vecchio S., Zannetti A., Iommelli F., Lettieri A., Brunetti A., Salvatore M. Molecular imaging of tumor microenvironment: challenges and perspectives. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Jun. 54 (3) : 249 – 258.

41. Wise DR., Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010 Aug. 35 (8) : 427 – 433.
42. Milner JA. Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap. *Cancer Lett.* 2008 Oct 8. 269 (2) : 189 – 198. Epub 2008 Jul 2.
43. Annibaldi A., Widmann C. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Jul. 13 (4) : 466 – 470.
44. Ganapathy-Kanniappan S., Vali M., Kunjithapatham R., Buijs M., Syed LH., Rao PP., Ota S., Kwak BK., Loffroy R., Geschwind JF. 3-bromopyruvate: a new targeted antiglycolytic agent and a promise for cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010 Aug. 11 (5) : 510 – 517.
45. Capuano G, Rigamonti N, Grioni M, Freschi M, Bellone M. Modulators of arginine metabolism support cancer immunosurveillance. *BMC Immunol.* 2009 Jan 9. 10 : 1.
46. Badn W, Hegardt P, Fellert MA, Darabi A, Esbjörnsson M, Smith KE, Janelidze S, Salford LG, Visse E, Siesjö P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase enhances anti-tumour immune responses in rats immunized with IFN-gamma-secreting glioma cells. *Scand J Immunol.* 2007 Mar. 65 (3) : 289 - 297.
47. Vadrot N, Legrand A, Nello E, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity could be responsible for resistance or sensitivity to IFN-gamma-induced apoptosis in several human hepatoma cell lines. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Dec. 26 (12) : 901 - 913.
48. Hirst D, Robson T. Nitric oxide in cancer therapeutics: interaction with cytotoxic chemotherapy. *Curr Pharm Des.* 2010. 16 (4) : 411 - 420.
49. Thatcher GR. An introduction to NO-related therapeutic agents. *Curr Top Med Chem.* 2005. 5 (7) : 597 - 601.

50. González-Pérez A, Clària J. New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem.* 2007. 7 (3) : 297 - 309.
51. Goossens L, Pommery N, Hénichart JP. COX-2/5-LOX dual acting anti-inflammatory drugs in cancer chemotherapy. *Curr Top Med Chem.* 2007. 7 (3) : 283 - 296.
52. Chen X, Sood S, Yang CS, Li N, Sun Z. Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcino-genesis and cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006 Nov. 6 (7) : 613 - 622.
53. Mazhar D, Ang R, Waxman J. COX inhibitors and breast cancer. *Br J Cancer.* 2006 Feb 13. 94 (3) : 346 - 350.
54. Poff CD, Balazy M. Drugs that target lipoxygenases and leukotrienes as emerging therapies for asthma and cancer. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004 Mar. 3 (1) : 19 - 33.
55. Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol.* 2004 Apr. 31 (2 Suppl 7) : 22 - 29.
56. Verginadis II, Karkabounas S, Simos Y, Kontargiris E, Hadjidakou SK, Batistatou A, Evangelou A, Charalabopoulos K. Anticancer and cytotoxic effects of a triorganotin compound with 2-mercapto-nicotinic acid in malignant cell lines and tumor bearing Wistar rats. *Eur J Pharm Sci.* 2011 Feb 14. 42 (3) : 253 - 261. Epub 2010 Dec 3.
57. Georgiou E, Metsios A, Kourkoumelis N, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Badeka A, Hadjidakou SK. Inhibition of lipoxygenase (LOX) and anticancer activity caused by gold(I) mixed ligands complexes of triphenylphosphine and thioamides. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2010 Nov 19. [Epub ahead of print].

58. Kyros L, Kourkoumelis N, Kubicki M, Male L, Hursthouse MB, Verginadis II, Gouma E, Karkabounas S, Charalabopoulos K, Hadjidakou SK. Structural properties, cytotoxicity, and anti-inflammatory activity of silver(I) complexes with tris(p-tolyl)phosphine and 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole. *Bioinorg Chem Appl.* 2010 : 386860. Epub 2010 Mar 29.
59. Abdallah MA, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Kubicki M, Bakas T, Kourkoumelis N, Simos YV, Karkabounas S, Barsan MM, Butler IS. Synthesis, characterization, and biological studies of organotin(IV) derivatives with o- or p-hydroxybenzoic acids. *Bioinorg Chem Appl.* 2009 : 542979. Epub 2009 Apr 15.
60. Balas VI, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Kourkoumelis N, Light ME, Hursthouse M, Metsios AK, Karkabounas S. Crystal structure and antitumor activity of the novel zwitterionic complex of tri-n-butyltin(IV) with 2-thiobarbituric acid. *Bioinorg Chem Appl.* 2008 : 654137.
61. Xanthopoulou MN, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Schürmann M, Jurkschat K, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Communication: synthesis of a novel triphenyltin(IV) derivative of 2-mercaptonicotinic acid with potent cytotoxicity in vitro. *Bioinorg Chem Appl.* 2003 : 227 - 231.
62. Hadjidakou SK, Ozturk II, Xanthopoulou MN, Zachariadis PC, Zartilas S, Karkabounas S, Hadjiliadis N. Synthesis, structural characterization and biological study of new organotin(IV), silver(I) and antimony(III) complexes with thioamides. *J Inorg Biochem.* 2008 May-Jun. 102 (5-6) : 1007 - 1015. Epub 2008 Jan 8.
63. Xanthopoulou MN, Hadjidakou SK, Hadjiliadis N, Milaeva ER, Gracheva JA, Tyurin VY, Kourkoumelis N, Christoforidis KC, Metsios AK, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Biological studies of new organotin(IV) complexes of thioamide ligands. *Eur J Med Chem.* 2008 Feb. 43 (2) : 327 - 335. Epub 2007 Apr 10.

64. Karkabounas S, Kostoula OK, Daskalou T, Veltsistas P, Karamouzis M, Zelovitis I, Metsios A, Lekkas P, Evangelou AM, Kotsis N, Skoufos I. Karkabounas S, Kostoula OK, Daskalou T, Veltsistas P, Karamouzis M, Zelovitis I, Metsios A, Lekkas P, Evangelou AM, Kotsis N, Skoufos I. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp Oncol*. 2006 Jun. 28 (2) : 121 - 125.
65. Charalabopoulos K, Karkabounas S, Dimicco P, Binolis J, Charalabopoulos A, Zelovitis J, Avdikos A, Metsios A, Peschos D, Agnantis NJ, Evangelou A. The role of ascorbic acid, selenium, and glutathione on benzo[a]pyrene-induced carcinogenesis in wistar rats. *J BUON*. 2004 Apr-Jun. 9 (2) : 187 - 192.
66. Papaioannou A, Manos M, Karkabounas S, Liasko R, Evangelou AM, Correia I, Kalfakakou V, Pessoa JC, Kabanos T. Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. *J Inorg Biochem*. 2004 Jun. 98 (6) : 959 - 968.
67. Xanthopoulou MN, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N, Schürmann M, Jurkschat K, Michaelides A, Skoulika S, Bakas T, Binolis J, Karkabounas S, Charalabopoulos K. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of organotin(IV) derivatives of heterocyclic thioamides, 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid. *J Inorg Biochem*. 2003 Aug 1. 96 (2-3) : 425 - 434.
68. Charalabopoulos K, Karkabounas S, Charalabopoulos AK, Papalimneou V, Ioachim E, Giannakopoulos X. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced carcinogenesis by vitamin C alone and by vitamin C/vitamin E and selenium/glutathione. *Biol Trace Elem Res*. 2003 Summer. 93 (1-3) : 201 - 212.

69. Karkabounas S, Assimakopoulos D, Malamas M, Skaltsounis AL, Leonce S, Zelovitis J, Stefanou D, Evangelou A. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. *Anticancer Res.* 2000 Nov-Dec. 20 (6B) : 4391 - 4395.
70. Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, Collery P, Evangelou A. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res.* 1998 Sep-Oct. 18 (5A) : 3609 - 3613.
71. Evangelou A, Karkabounas S, Kalpouzios G, Malamas M, Liasko R, Stefanou D, Vlahos AT, Kabanos TA. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett.* 1997 Nov 11. 119 (2) : 221 - 225.
72. Evangelou A, Kalpouzios G, Karkabounas S, Liasko R, Nonni A, Stefanou D, Kallistratos G. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Cancer Lett.* 1997 May 1. 115 (1) : 105 - 111.
73. Kallistratos GI, Fasske EE, Karkabounas S, Charalambopoulos K. Prolongation of the survival time of tumor bearing Wistar rats through a simultaneous oral administration of vitamins C + E and selenium with glutathione. *Prog Clin Biol Res.* 1988. 259 : 377 - 389.
74. Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH Jr, Adrian TE. A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs.* 2005 Jun. 16 (5) : 467 - 473.
75. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec. 26 (3-4) : 503 - 524.

76. Richardson CM, Sharma RA, Cox G, O'Byrne KJ. Epidermal growth factor receptors and cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of non-small cell lung cancer: potential targets for chemoprevention and systemic therapy. *Lung Cancer*. 2003 Jan. 39 (1) : 1 - 13.
77. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003 Jan 7. 2 : 10.
78. Scott KF, Sajinovic M, Hein J, Nixdorf S, Galettis P, Liauw W, de Souza P, Dong Q, Graham GG, Russell PJ. Scott KF, Sajinovic M, Hein J, Nixdorf S, Galettis P, Liauw W, de Souza P, Dong Q, Graham GG, Russell PJ. Emerging roles for phospholipase A2 enzymes in cancer. *Biochimie*. 2010 Jun. 92 (6) : 601 - 610. Epub 2010 Mar 31.
79. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 Jun. 39 (2) : 401 - 418, table of contents.
80. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Mar. 10 (3) : 181 - 193. Epub 2010 Feb 19.
81. Moreno JJ. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. *Biochem Pharmacol*. 2009 Jan 1. 77 (1) : 1 - 10. Epub 2008 Aug 5.
82. Krishnamoorthy S, Honn KV. Eicosanoids in tumor progression and metastasis. *Subcell Biochem*. 2008. 49 : 145 - 168.
83. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug. 659 (1-2) : 15 - 30. Epub 2008 Mar 16.
84. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec. 26 (3-4) : 525 - 534.
85. Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem*. 2010. 52 : 145 - 167.

86. Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol.* 2011 Jan. 22 Suppl 1 : 124 - 130.
87. Lal A, Ames BN. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis.* 2011 Jan. 26 (1) : 57 - 62.
88. Unoki M. Current and potential anticancer drugs targeting members of the UHRF1 complex including epigenetic modifiers. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2011 Jan. 6 (1) : 116 - 130.
89. Zámečníkova A. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia as a model of rational drug design in cancer. *Expert Rev Hematol.* 2010 Feb. 3 (1) : 45 - 56.
90. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Nov. 36 (8) : 888 - 906. Epub 2010 Nov 3.
91. Reynoird N, Rousseaux S, Khochbin S. Epigenetic perturbations and cancer: innovative therapeutic strategies against cancer. *Bull Cancer.* 2010 Nov. 97 (11) : 1265 - 1274.
92. Pavet V, Portal MM, Moulin JC, Herbrecht R, Gronemeyer H. Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene.* 2011 Jan 6. 30 (1) : 1 - 20. Epub 2010 Oct 11.
93. Tysnes BB. Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia.* 2010 Jul. 12 (7) : 506 - 515.
94. Li P, Waldman SA. Corruption of homeostatic mechanisms in the guanylyl cyclase C signaling pathway underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Biol Ther.* 2010 Aug. 10 (3) : 211 - 218. Epub 2010 Aug 11.
95. Pár A. Hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis. *Orv Hetil.* 2010 Jun 27. 151 (26) : 1045 - 1053.

96. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010 Jun. 118 (6-7) : 471 - 493.
97. Castellanos A, Vicente-Dueñas C, Campos-Sánchez E, Cruz JJ, García-Criado FJ, García-Cenador MB, Lazo PA, Pérez-Losada J, Sánchez-García I. Cancer as a reprogramming-like disease: implications in tumor development and treatment. *Semin Cancer Biol*. 2010 Apr. 20 (2) : 93 - 97. Epub 2010 Feb 24.
98. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan. 31 (1) : 9 - 18. Epub 2009 Nov 3.
99. Samanta M, Takada K. Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Sci*. 2010 Jan. 101 (1) : 29 - 35. Epub 2009 Sep 29.
100. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan. 31 (1) : 27 - 36. Epub 2009 Sep 13.
101. Larson RA, Golomb HM, Rowley JD. Chromosome changes in hematologic malignancies. *CA Cancer J Clin*. 1981 Jul-Aug. 31 (4) : 222 - 238.
102. Fry RJ, Ainsworth EJ. Radiation injury: some aspects of the oncogenic effects. *Fed Proc*. 1977 Apr. 36 (5) : 1703 - 1707.
103. Mekler LB. On the problem of oncogene of tumour viruses. *Acta Virol*. 1975 Nov. 19 (6) : 501 - 508.
104. Sheinin R. Viruses: causative agents of cancer. *Laryngoscope*. 1975 Mar. 85 (3) : 468 - 486.
105. Philip T, Lenoir GM, Favrot M, Philip I, Brunat-Mentigny M. Burkitt's lymphoma in 1985. [Article in French] *Pediatric*. 1985 Mar. 40 (2) : 137 - 160.

106. Chorazy M. Sequence rearrangements and genome instability. A possible step in carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1985. 109 (3) : 159 -172.
107. Smith KT, Campo MS. The biology of papillomaviruses and their role in oncogenesis. *Anticancer Res.* 1985 Jan-Feb. 5 (1) : 31 - 47.
108. Haber M, Stewart BW. Oncogenes. A possible role for cancer genes in human malignant disease. *Med J Aust.* 1985 Apr 1. 142 (7) : 402 - 406.
109. Antohi S, Antohi-Talle O. Viral oncogenes, proto-oncogenes and homoeotic genes related to cell proliferation and differentiation. *Virologie.* 1987 Jan-Mar. 38 (1) : 61 - 70.
110. Gebhart E. Clastogenic action of chemotherapy in humans (review). *In Vivo.* 1987 Jan-Feb. 1 (1) : 15 - 21.
111. Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep.* 1986 Aug. 6 (8) : 691 - 708.
112. Pedersen-Bjergaard J, Andersson P, Philip P. Possible pathogenetic significance of specific chromosome abnormalities and activated proto-oncogenes in malignant diseases of man. *Scand J Haematol.* 1986 Feb. 36 (2) : 127 - 137.
113. Sanford KK, Parshad R, Gantt RR, Tarone RE. A deficiency in chromatin repair, genetic instability, and predisposition to cancer. *Crit Rev Oncog.* 1989. 1 (3) : 323 - 341.
114. Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1990 Jan. 1 (3) : 181 - 193.
115. Lüke-Huhle C. Review: gene amplification--a cellular response to genotoxic stress. *Mol Toxicol.* 1989 Oct-Dec. 2 (4) : 237 - 253.

116. Khoobyarian N, Marczyńska B. Transformation of primate cells by chemicals and oncogenes: requirements for multiple factors. *Anticancer Res.* 1989 Sep-Oct. 9 (5) : 1367 - 1376.
117. Ananthaswamy HN, Pierceall WE. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 1990 Dec. 52 (6) : 1119 - 1136.
118. Lehmann AR, Bridges BA. Sunlight-induced cancer: some new aspects and implications of the xeroderma pigmentosum model. *Br J Dermatol.* 1990 Apr. 122 Suppl 35 : 115 - 119.
119. Cannistra SA. Chronic myelogenous leukemia as a model for the genetic basis of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1990 Apr. 4 (2) : 337 - 357.
120. Croce CM. Genetic approaches to the study of the molecular basis of human cancer. *Cancer Res.* 1991 Sep 15. 51 (18 Suppl) : 5015s - 5018s.
121. Rhim JS. Current state-of-the-art in human cell transformation in culture. *Yonsei Med J.* 1991 Sep. 32 (3) : 195 - 206.
122. Clemens MR. Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klin Wochenschr.* 1991 Dec 15. 69 (21-23) : 1123 - 1134.
123. Framp A. Working toward an understanding of the impact of hereditary cancers. *Gastroenterol Nurs.* 2010 Nov-Dec. 33 (6) : 400 – 405. quiz 406 - 407.
124. Boley SJ, Brandt LJ, Mitsudo SM. Vascular lesions of the colon. *Adv Intern Med.* 1984. 29 : 301 - 326.
125. Lynch HT, Guirgis HA, Lynch PM, Lynch JF, Harris RE. Familial cancer syndromes: a survey. *Cancer.* 1977 Apr. 39 (4 Suppl) : 1867 - 1881.
126. Wennstrom J, Pierce ER, McKusick VA. Hereditary benign and malignant lesions of the large bowel. *Cancer.* 1974 Sep. 34 (3) : suppl : 850 - 857.

127. Murday V, Slack J. Inherited disorders associated with colorectal cancer. *Cancer Surv.* 1989. 8 (1) : 139 - 157.
128. Järvinen HJ. Familial cancer. A review on hereditary cancer traits with special regard to colorectal carcinoma. *Acta Oncol.* 1988. 27 (6b) : 783 - 786.
129. Kee F, Collins BJ. Families at risk of colorectal cancer: who are they? *Gut.* 1992 Jun. 33 (6) : 787 - 790.
130. Reiners C. Radioactivity and thyroid cancer. *Hormones (Athens).* 2009 Jul-Sep. 8 (3) : 185 - 191.
131. Jargin SV. Thyroid carcinoma in children and adolescents resulting from the Chernobyl accident: possible causes of the incidence increase overestimation. *Cesk Patol.* 2009 Apr. 45 (2) : 50 - 52.
132. Howe GR. Leukemia following the Chernobyl accident. *Health Phys.* 2007 Nov. 93 (5) : 512 - 515.
133. Craft E, Abu-Qare A, Flaherty M, Garofolo M, Rincavage H, Abou-Donia M. Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2004 Jul-Aug. 7 (4) : 297 - 317.
134. Bem H, Bou-Rabee F. Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War. *Environ Int.* 2004 Mar. 30 (1) : 123 - 134.
135. Muschel RJ, Soto DE, McKenna WG, Bernhard EJ. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogene.* 1998 Dec 24. 17 (25) : 3359 - 3363.
136. Mays CW. Alpha-particle-induced cancer in humans. *Health Phys.* 1988 Oct. 55 (4) : 637 - 652.
137. Mays CW. Cancer induction in man from internal radioactivity. *Health Phys.* 1973 Dec. 25 (6) : 585 - 592.

138. Goldman M. Ionizing radiation and its risks. *West J Med.* 1982 Dec. 137 (6) : 540 - 547.
139. Ameziane-El-Hassani R, Boufrajech M, Lagente-Chevallier O, Weyemi U, Talbot M, Métivier D, Courtin F, Bidart JM, El Mzibri M, Schlumberger M, Dupuy C. Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer Res.* 2010 May 15. 70 (10) : 4123 - 4132. Epub 2010 Apr 27.
140. Myers LS Jr, Carmichael AJ, Pellmar TC. Radiation chemistry of the hippocampal brain slice. *Adv Space Res.* 1994 Oct. 14 (10) : 453 - 456.
141. Basly JP, Basly I, Bernard M. Radiation-induced effects on cefotaxime: ESR study. *Free Radic Res.* 1998 Jul. 29 (1) : 67 - 73.
142. Burmeister WP. Structural changes in a cryo-cooled protein crystal owing to radiation damage. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2000 Mar. 56 (Pt 3) : 328 - 341.
143. DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, Hanfling D, Dainiak N, Chao N, Bader JL, Coleman CN, Weinstock DM. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. *Disaster Med Public Health Prep.* 2011 Mar. 5 Suppl 1 : 532 - 544.
144. Beck E. The acute radiation syndrome. *Schweiz Med Wochenschr.* 1967 Sep 2. 97 (35) : 1155 - 1156.
145. Kamarád V. Acute radiation sickness--morphology of CNS syndrome. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1989. 121 : 7 - 144.
146. Pullman A, Pullman B. Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules: new developments. *Acta Unio Int Contra Cancrum.* 1954. 10 (2) : 153 - 154.
147. Pullman A, Pullman B. Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules; new developments. *Adv Cancer Res.* 1955. 3 : 117 - 169.

148. Pullman A. Aspects of the electronic structure of new types of aromatic carcinogenic compounds. [Article in French]. C R Hebd Seances Acad Sci. 1963 Jul 1. 257 : 288 - 290.
149. Flurry R Jr. A simple method for predicting the carcinogenic properties of polycyclic aromatic molecules. J Med Chem. 1964 Sep. 7 : 668 - 670.
150. Nagata C, Fukui K, Yonezawa T, Tagashira Y. Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic compounds. I. Condensed aromatic hydrocarbons. Cancer Res. 1955 May. 15 (4) : 233 - 239.
151. Fukui K, Nagata C, Yonezawa T, Inamoto Y, Imamura A. Electronic structure and carcinogenic activity of conjugated compounds, substituted aromatic hydrocarbons, heteroaromatic compounds and azo compounds. Gann. 1960 Mar. 51 : 67 - 81.
152. Vijayalakshmi KP, Suresh CH. Theoretical studies on the carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. J Comput Chem. 2008 Aug. 29 (11) : 1808 - 1817.
153. Fukui K, Nagata C, Imamura A, Tagashira Y. On the relation between electronic structure and carcinogenic activity of urethan (ethylcarbamate) and related compounds. Gann. 1961 Jun. 52 : 127 - 134.
154. Benigni R, Bossa C. Structure-activity models of chemical carcinogens: state of the art, and new directions. Ann Ist Super Sanita. 2006. 42 (2) : 118 - 126.
155. Benigni R, Bossa C, Netzeva T, Rodomonte A, Tsakovska I. Mechanistic QSAR of aromatic amines: new models for discriminating between homocyclic mutagens and nonmutagens, and validation of models for carcinogens. Environ Mol Mutagen. 2007 Dec. 48 (9) : 754 - 771.
156. Vijayalakshmi KP, Suresh CH. Theoretical studies on the carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. J Comput Chem. 2008 Aug. 29 (11) : 1808 - 1817.

157. Fukui K, Nagata C, Imamura A, Yonezawa T, Tagashira Y. Relationship between the electronic structure and carcinogenic activity of acetamidofluorene and related compounds. *Gann*. 1962 Mar. 53 : 25 - 40.
158. Borosky GL. Quantum chemical studies on ultimate carcinogenic metabolites from polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Med Chem*. 2008. 15 (28) : 2901 - 2920.
159. Sharovskaya J, Kobliakova I, Solomatina N, Kobliakov V. Effect of some carcinogenic and non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intercellular communication in hepatoma cell cultures. *Eur J Cell Biol*. 2006 May. 85 (5) : 387 - 397. Epub 2006 Jan 10.
160. Borosky GL. Ultimate carcinogenic metabolites from aromatic and heterocyclic aromatic amines: a computational study in relation to their mutagenic potency. *Chem Res Toxicol*. 2007 Feb. 20 (2) : 171 - 180. Epub 2007 Jan 30.
161. Brockstedt U, Uzarowska A, Montpetit A, Pfau W, Labuda D. In vitro evolution of RNA aptamers recognizing carcinogenic aromatic amines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 23. 313 (4) : 1004 - 1008.
162. Venkatapathy R, Wang CY, Bruce RM, Moudgal C. Development of quantitative structure-activity relationship (QSAR) models to predict the carcinogenic potency of chemicals I. Alternative toxicity measures as an estimator of carcinogenic potency. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jan 15. 234 (2) : 209 - 221. Epub 2008 Oct 15.
163. Cantero A. Carcinogenesis: Mechanism and Criteria of Carcinogenic Activity. *Can Med Assoc J*. 1962 Sep 29. 87 (13) : 690 - 693.
164. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. 2007 Dec. 79 (4) : 593 - 616.

165. Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.* 2008 Sep 1. 68 (17) : 6863 - 6872.
166. Lang M. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *Pelkonen OIARC Sci Publ.* 1999. (148) : 13 - 22.
167. Parke DV. The cytochromes P450 and mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1994 Oct. 102 (10) : 852 - 853. Review.
168. Ma Q, Lu AY. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos.* 2007 Jul. 35 (7) : 1009 - 1016.
169. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 2000. 1 (6) : REVIEWS 3003. Epub 2000 Dec 8. Review.
170. Graziewicz MA, Sayer JM, Jerina DM, Copeland WC. Nucleotide incorporation by human DNA polymerase gamma opposite benzo[a]pyrene and benzo[c]phenanthrene diol epoxide adducts of deoxyguanosine and deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 16. 32 (1) : 397 - 405. Print 2004.
171. Yoon JH, Smith LE, Feng Z, Tang M, Lee CS, Pfeifer GP. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res.* 2001 Oct 1. 61 (19) : 7110 - 7117.
172. Marnett LJ, Ji C. Modulation of oxidant formation in mouse skin in vivo by tumor-promoting phorbol esters. *Cancer Res.* 1994 Apr 1. 54 (7 Suppl) : 1886s - 1889s. Review.
173. Ji C, Marnett LJ. Oxygen radical-dependent epoxidation of (7S,8S)-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in mouse skin in vivo. Stimulation by phorbol esters and inhibition by antiinflammatory steroids. *J Biol Chem.* 1992 Sep 5. 267 (25) : 17842 - 17848.

174. Pruess-Schwartz D, Nimesheim A, Marnett LJ. Peroxyl radical and cytochrome P-450-dependent metabolic activation of (+)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene in mouse skin in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1989 Apr 1. 49 (7) : 1732 - 1737.
175. Eling T, Curtis J, Battista J, Marnett LJ. Oxidation of (+)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by mouse keratinocytes: evidence for peroxyl radical- and monooxygenase-dependent metabolism. *Carcinogenesis.* 1986 Dec. 7 (12) : 1957 - 1963.
176. Melikian AA, Bagheri K, Hoffmann D. Oxidation and DNA binding of (+)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene in mouse epidermis in vivo and effects of coadministration of catechol. *Cancer Res.* 1990 Mar 15. 50 (6) : 1795 - 1799.
177. Witz G. Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Nov. 198 (2) : 675 - 682.
178. Toyokuni S. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Rep.* 2002. 7 (4) : 189 - 197.
179. Rana SV. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol.* 2008. 22 (4) : 262 - 284. Epub 2008 Oct 10.
180. Kasprzak KS. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002 May 15. 32 (10) : 958 - 967.
181. Petersen DR. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. *Alcohol.* 2005 Apr. 35 (3) : 243 - 249.
182. Buzard GS, Kasprzak KS. Possible roles of nitric oxide and redox cell signaling in metal-induced toxicity and carcinogenesis: a review. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000. 19 (3) : 179 - 199.

183. Bishayee A, Waghray A, Patel MA, Chatterjee M. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: the in vivo evidence. *Cancer Lett.* 2010 Aug 1. 294 (1) : 1 - 12. Epub 2010 Mar 4.
184. Toyokuni S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 1996. 20 (4) : 553 - 566.
185. Sarkar B. Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and its relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation. *Nutrition.* 1995 Sep-Oct. 11 (5 Suppl) : 646 - 649.
186. Kasprzak KS. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.* 1995. 13 (4) : 411 - 430.
187. Belitsky GA, Yakubovskaya MG. Genetic polymorphism and variability of chemical carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008 May. 73 (5) : 543 - 554.
188. Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 2006 May. 15 (4) : 333 - 340. Epub 2006 May 5.
189. Dashwood RH. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat Res.* 2002 Jun. 511 (2) : 89 - 112.
190. Michielsen P, Ho E. Viral hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg.* 2011 Mar. 74 (1) : 4 - 8.
191. Gao P, Zheng J. Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers. *Cancer Lett.* 2011 Apr 1. 303 (1) : 1 - 8.
192. Jolly C. Cell-to-cell transmission of retroviruses: Innate immunity and interferon-induced restriction factors. *Virology.* 2011 Mar 15. 411 (2) : 251 - 259. Epub 2011 Jan 17.

193. Rajčáni J, Asványi-Molnár N, Szathmary S. Herpesvirus-associated lymphomas: Investigations in humans and animal models. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010 Dec. 57 (4) : 349 - 376.
194. Sinkovics JG. Antileukemia and antitumor effects of the graft-versus-host disease: a new immunovirological approach. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010 Dec. 57 (4) : 253 – 347.
195. Zheng ZM. Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses. *Int J Biol Sci.* 2010 Dec 1. 6 (7) : 730 - 755.
196. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene.* 2011 Mar 24. 30 (12) : 1379 - 1389.
197. Tan A, De La Peña H, Seifalian AM. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine.* 2010 Nov 10. 5 : 889-900.
198. Saha A, Kaul R, Murakami M, Robertson ES. Tumor viruses and cancer biology: Modulating signaling pathways for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther.* 2010 Nov. 10 (10) : 961 – 978.
199. Yoshida M. Molecular approach to human leukemia: isolation and characterization of the first human retrovirus HTLV-1 and its impact on tumorigenesis in adult T-cell leukemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010. 86 (2) : 117 - 130.
200. Martin D, Gutkind JS. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene.* 2008 Dec. 27 Suppl 2 : S31 - 42.
201. Moreau-Gachelin F. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology.* 2008 Nov 4. 5 : 99.
202. Ross SR. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008 Sep. 13 (3) : 299 – 307.

203. Du Z, Li Y. RCAS-TVA in the mammary gland: an in vivo oncogene screen and a high fidelity model for breast transformation? *Cell Cycle*. 2007 Apr 1. 6 (7) : 823 - 826.
204. Mathews CK. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J*. 2006 Jul. 20 (9) : 1300 - 1314.
205. Mahieux R, Hermine O. In vivo and in vitro treatment of HTLV-1 and HTLV-2 infected cells with arsenic trioxide and interferon-alpha. *Leuk Lymphoma*. 2005 Mar. 46 (3) : 347 - 355.
206. Sweeney C, Carraway KL 3rd. Negative regulation of ErbB family receptor tyrosine kinases. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26. 90 (2) : 289 - 293.
207. Plachý J, Hejnar J. Chicken cells--oncogene transformation, immortalization and more. *Folia Biol (Praha)*. 2002. 48 (4) : 126 - 138.
208. Burmeister T. Oncogenic retroviruses in animals and humans. *Rev Med Virol*. 2001 Nov-Dec. 11 (6) : 369 - 380.
209. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 May 17. 411 (6835) : 355 - 365.
210. Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)*. 2000. 46 (6) : 226 - 232.
211. Todd R, Wong DT. Oncogenes. *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec. 19 (6A) : 4729 - 4746.
212. Jose DG, De Kretser T. Oncogenes of human tumour cells. A review of advances in virology and molecular biology of cancer. *Australas Radiol*. 1984 Feb. 28 (1) : 43 - 50.
213. Panigrahy D, Kaipainen A, Greene ER, Huang S. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Dec. 29 (4) : 723 - 735.

214. Rådmark O, Samuelsson B. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and 5-lipoxygenase: potential drug targets in cancer. *J Intern Med.* 2010 Jul. 268 (1) : 5 – 14.
215. Menna C, Olivieri F, Catalano A, Procopio A. Lipoxygenase inhibitors for cancer prevention: promises and risks. *Curr Pharm Des.* 2010. 16 (6) : 725 – 733.
216. Cathcart MC, Reynolds JV, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr. 1805 (2) : 153 - 166.
217. Comba A, Pasqualini ME. Primers on molecular pathways - lipoxygenases: their role as an oncogenic pathway in pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2009. 9 (6) : 724 - 728.
218. Bhattacharya S, Mathew G, Jayne DG, Pelengaris S, Khan M. 15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review. *Tumour Biol.* 2009. 30 (4) : 185 - 199.
219. Calviello G, Serini S, Piccioni E, Pessina G. Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies. *Nutr Cancer.* 2009. 61 (3) : 287-301.
220. Hyde CA, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jun. 9 (6) : 701 - 715.
221. Thun MJ, Blackard B. Pharmacologic effects of NSAIDs and implications for the risks and benefits of long-term prophylactic use of aspirin to prevent cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2009. 181 : 215 - 221.
222. Claesson HE. On the biosynthesis and biological role of eoxins and 15-lipoxygenase-1 in airway inflammation and Hodgkin lymphoma. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009 Sep. 89 (3-4) : 120 - 125.

223. Sahin M, Sahin E, Gümüslü S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. *Angiology*. 2009 Apr-May. 60 (2) : 242 - 253.
224. Wang D, DuBois RN. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28. 267 (2) : 197 - 203.
225. Marks F, Fürstenberger G, Müller-Decker K. Tumor promotion as a target of cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2007. 174 : 37 - 47.
226. Raspollini MR, Taddei GL. Cyclooxygenase-2: a novel target in human solid tumors. *Curr Oncol Rep*. 2007 Mar. 9 (2) : 96 - 101.
227. Chen X, Sood S, Yang CS, Li N, Sun Z. Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006 Nov. 6 (7) : 613 - 622.
228. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer*. 2010 Apr 13. 102 Suppl 1 : S2 - 9.
229. Mathupala SP. Metabolic targeting of malignant tumors: small-molecule inhibitors of bioenergetic flux. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2011 Jan. 6 (1) : 6 - 14.
230. Brahim-Horn MC, Bellot G, Pouysségur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2011 Feb. 21 (1) : 67 - 72. Epub 2010 Nov 11.
231. Bao J, Sack MN. Protein deacetylation by sirtuins: delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Sep. 67 (18) : 3073 - 3087. Epub 2010 Aug 3.
232. Meyerhardt JA, Ma J, Courneya KS. Energetics in colorectal and prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 10. 28 (26) : 4066 - 4073. Epub 2010 Jul 19.

233. Ballestar E. An introduction to epigenetics. 2011. 711 : 1 – 11 *Adv Exp Med Biol*.
234. Lambert MP, Herceg Z. Epigenetics and cancer. 2nd IARC meeting, Lyon, France, 6 and 7 December 2007. *Mol Oncol*. 2008 Jun. 2 (1) : 33 - 40. Epub 2008 Mar 27.
235. Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*. 2007 Mar. 22 (2) : 91 - 103. Epub 2007 Feb 6.
236. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJ, Anzalone L, Pezzani L, Di Giacomo AM, Fonsatti E, Colizzi F, Altomonte M, Calabrò L, Maio M. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol*. 2007 Aug. 212 (2) : 330 - 344.
237. Mai A, Altucci L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan. 41 (1) : 199 - 213. Epub 2008 Aug 22.
238. Vilgelm AE, Zaika AI, Prasolov VS. The coordinated interaction of multifunctional members of p53 family determines many key processes in multicellular organisms. *Mol Biol (Mosk)*. 2011 Jan-Feb. 45 (1) : 180 - 197. Review. Russian.
239. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25. 331 (6024) : 1559 - 1564.
240. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res*. 2011 Mar. 21 (3) : 502 - 517. Epub 2011 Feb 15.
241. Stenman G, Andersson MK, Andrén Y. New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer. *Cell Cycle*. 2010 Aug 1. 9(15) : 2986 - 2995. Epub 2010 Aug 28.

242. Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Dec 1. 2 (12) : a000893. Epub 2010 May 12.
243. Azad N, Iyer A, Vallyathan V, Wang L, Castranova V, Stehlik C, Rojanasakul Y. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Aug. 1203 : 1 – 6.
244. Skorski T. Chronic myeloid leukemia cells refractory/resistant to tyrosine kinase inhibitors are genetically unstable and may cause relapse and malignant progression to the terminal disease state. *Leuk Lymphoma.* 2011 Feb. 52 Suppl 1 : 23 - 29.
245. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011 May. 351 (1-2) : 41 - 58. Epub 2011.
246. Jackson BC, Carpenter C, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Hum Genomics.* 2010 Jun. 4 (5) : 345 - 352.
247. Borutaite V. Mitochondria as decision-makers in cell death. *Environ Mol Mutagen.* 2010 Jun. 51 (5) : 406 - 416.
248. Watson DK, Ascione R, Papas TS. Molecular analysis of the ets genes and their products. *Crit Rev Oncog.* 1990. 1 (4) : 409 - 436.
249. Westbrook CA. The ABL oncogene in human leukemias. *Blood Rev.* 1988 Mar. 2 (1) : 1 - 8.
250. Vogt PK, Bos TJ. Jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res.* 1990. 55 : 1 - 35.
251. Peacocke M, Campisi J. Cellular senescence: a reflection of normal growth control, differentiation, or aging? *J Cell Biochem.* 1991 Feb. 45 (2) : 147 - 155.

252. Srivastava PK, Maki RG. Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991. 167 : 109 - 123.
253. Scharl M, Adam D. Molecular cloning, structural characterization, and analysis of transcription of the melanoma oncogene of xiphophorus. *Pigment Cell Res*. 1992. Suppl 2 : 173 - 180.
254. Daley GQ. Animal models of BCR/ABL-induced leukemias. *Leuk Lymphoma*. 1993. 11 Suppl 1 : 57 - 60.
255. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet*. 1995 Mar. 11 (3) : 101 - 105.
256. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*. 1994 Nov. 19 (11) : 474 - 480.
257. Manfredi JJ, Prives C. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta*. 1994 May 27. 1198 (1) : 65 - 83.
258. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994. 12 : 141 - 179.
259. Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linette GP, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994. 59 : 387 - 393.
260. Hurle JM, Ros MA, Garcia-Martinez V, Macias D, Gañan Y. Cell death in the embryonic developing limb. *Scanning Microsc*. 1995 Jun. 9 (2) : 519 - 533. Discussion 533 - 534.
261. Packham G, Cleveland JL. c-Myc and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Jul 28. 1242 (1) : 11 - 28.
262. Postel-Vinay MC, Finidori J. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *Eur J Endocrinol*. 1995 Dec. 133 (6) : 654 - 659.

263. Spelsberg TC, Lauber AH, Sandhu NP, Subramaniam M. A nuclear matrix acceptor site for the progesterone receptor in the avian c-myc gene promoter. *Recent Prog Horm Res.* 1996. 51 : 63 - 96.
264. Biały M, Kaczmarek L. c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1996. 56 (2) : 567 - 577.
265. Pass HI, Kennedy RC, Carbone M. Evidence for and implications of SV40-like sequences in human mesotheliomas. *Important Adv Oncol.* 1996 : 89 - 108.
266. Clutton S. The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull.* 1997. 53 (3) : 662 - 668.
267. Tata JR. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Cell Res.* 1998 Dec. 8 (4) : 259 - 272.
268. Kiyokawa E, Mochizuki N, Kurata T, Matsuda M. Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Crit Rev Oncog.* 1997. 8 (4) : 329 - 342.
269. Smit L, Borst J. The Cbl family of signal transduction molecules. *Crit Rev Oncog.* 1997. 8 (4) : 359 - 379.
270. Dhulipal PD. Ets oncogene family. *Indian J Exp Biol.* 1997 Apr. 35 (4) : 315 - 322.
271. Smith K, Dalton S. Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. *Regen Med.* 2010 Nov. 5 (6) : 947 - 959.
272. Durchdewald M, Angel P, Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease. *Histol Histopathol.* 2009 Nov. 24 (11) : 1451 - 1461.

273. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008. 10 (1) : 201. Epub 2008 Jan 18.
274. Ceseña TI, Cui TX, Piwien-Pilipuk G, Kaplani J, Calinescu AA, Huo JS, Iñiguez-Lluhí JA, Kwok R, Schwartz J. Multiple mechanisms of growth hormone-regulated gene transcription. *Mol Genet Metab*. 2007 Feb. 90 (2) : 126 - 133. Epub 2006 Nov 28.
275. Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar. 70 Suppl 1 : i109 - 112.
276. Shaulian E. AP-1- The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal*. 2010 Jun. 22 (6) : 894 - 899. Epub 2010 Jan 11.
277. Ye L, Mason MD, Jiang WG. Bone morphogenetic protein and bone metastasis, implication and therapeutic potential. *Front Biosci*. 2011 Jan 1. 16 : 865 - 897.
278. Overmeyer JH, Maltese WA. Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. *Front Biosci*. 2011 Jan 1. 16 : 1693 - 1713.
279. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol*. 2011 Jan. 223 (2) : 10215.
280. Bergmann A, Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010 Oct 26. 3 (145) : re 8.
281. Vizirianakis IS, Chatzopoulou M, Bonovolias ID, Nicolaou I, Demopoulos VJ, Tsiftoglou AS. Toward the development of innovative bifunctional agents to induce differentiation and to promote apoptosis in leukemia: clinical candidates and perspectives. *J Med Chem*. 2010 Oct 14. 53 (19) : 6779 – 6810.

282. Tapia N, Schöler HR. p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *J Exp Med*. 2010 Sep 27. 207 (10) : 2045 - 2048.
283. Gudas LJ, Wagner JA. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol*. 2011 Feb. 226 (2) : 322 - 330.
284. Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Oct 30. 62 (13) : 1285 - 1298.
285. Guo H, Tian T, Nan K, Wang W. p57: A multifunctional protein in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2010 Jun. 36 (6) : 1321 - 1329.
286. Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol*. 2010 May. 20 (5) : 299 - 309.
287. Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2010 Apr. 101 (4) : 831 - 835.
288. Konishi K, Yonai M, Kaneyama K, Ito S, Matsuda H, Yoshioka H, Nagai T, Imai K. Relationships of Survival Time, Productivity and Cause of Death with Telomere Lengths of Cows Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer. *J Reprod Dev*. 2011.
289. Eisenberg DT. An evolutionary review of human telomere biology: The thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. *Am J Hum Biol*. 2011 Mar-Apr. 23 (2) : 149 - 167.
290. Gertler R, Doll D, Maak M, Feith M, Rosenberg R. Telomere length and telomerase subunits as diagnostic and prognostic biomarkers in Barrett carcinoma. *Cancer*. 2008 May 15. 112 (10) : 2173 - 2180.
291. Nakamura K, Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Kishimoto H, Fujiwara M, Kato M, Oshimura M, Ishii A, Ishikawa N. Telomeric DNA length in cerebral gray and white matter is associated with longevity in individuals aged 70 years or older. *Exp Gerontol*. 2007 Oct. 42 (10) : 944 – 950.

292. Martin-Ruiz C, Dickinson HO, Keys B, Rowan E, Kenny RA, Von Zglinicki T. Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline. *Ann Neurol.* 2006 Aug. 60 (2) : 174 - 180.
293. Kang MK, Park NH. Extension of cell life span using exogenous telomerase. *Methods Mol Biol.* 2007. 371 : 151 - 165.
294. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol.* 1998 Feb 26. 8 (5) : 279 - 282.
295. Harley CB, Kim NW. Telomerase and cancer. *Important Adv Oncol.* 1996 : 57 - 67.
296. Fischer DS. The use of drugs in various types of cancer. 1. *Conn Med.* 1970 Dec. 34 (12) : 903.
297. Bergevin PR, Tormey DC, Blom J. Guide to the use of cancer chemotherapeutic agents. *Mod Treat.* 1972 May. 9 (2) : 185 – 273.
298. Montgomery JA. The current status of cancer chemotherapy. *Prog Drug Res.* 1976. 20 : 465 – 490.
299. Newlands ES. The current role of cancer chemotherapy. *Br J Radiol.* 1978 Oct. 51 (610) : 756 - 770.
300. Jewers K. Recent developments in cancer chemotherapy. *Prog Drug Res.* 1981. 25 : 275 – 360.
301. Eckhardt S. Potentiation of antimetabolite action by alkylating agents. *Adv Enzyme Regul.* 1985. 24 : 143 - 153.
302. Foon KA, Hallek MJ. Changing paradigms in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2010 Mar. 24 (3) : 500 - 511.
303. Lamanna N. Challenges in the frontline treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2010 Jan. 5 (1) : 45 – 51.

304. Rourke M, Anderson KC, Ghobrial IM. Review of clinical trials conducted in Waldenstrom macroglobulinemia and recommendations for reporting clinical trial responses in these patients. *Leuk Lymphoma*. 2010 Oct. 51 (10) : 1779 – 1792.
305. Cheson BD, Rummel MJ. Bendamustine: rebirth of an old drug. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 20. 27 (9) : 1492 – 1501.
306. Kalaycio M. Bendamustine: a new look at an old drug. *Cancer*. 2009 Feb 1. 115 (3) : 473 - 479.
307. Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB. Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk Lymphoma*. 1996.
308. Kovach JS, Beart RW. Cellular pharmacology of fluorinated pyrimidines in vivo in man. *Jr.nvest New Drugs*. 1989 Apr. 7 (1) : 13 – 25.
309. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol*.1995 Sep. 13 (9) : 2431 – 2448.
310. Schmoll HJ. Development of treatment for advanced colorectal cancer: infusional 5-FU and the role of new agents. *Eur J Cancer*. 1996. 32A Suppl 5 : S18 – 22.
311. Copley-Merriman C, Corral J, King K, Whiteside R, Voi M, Dorr FA, McDonald RC. Economic value of gemcitabine compared to cisplatin and etoposide in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1996 Feb. 14 (1) : 45 – 61.
312. Fennelly D, Kelsen DP. The role of chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology*. 1996 Mar-Apr. 43 (8) : 356 – 362.
313. Morris DL, Zhao J, Clingan PR. Previous intravenous chemotherapy does not alter response rate or survival time of patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by hepatic artery chemotherapy. *Aust N Z J Surg*. 1997 Nov. 67 (11) : 796 - 797.

314. Trippett TM, Bertino JR. Therapeutic strategies targeting proteins that regulate folate and reduced folate transport. *J Chemother.* 1999 Feb. 11 (1) : 3 - 10.
315. Zielinski CC. Gemcitabine/anthracycline combinations in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2002 May. 3 Suppl 1 : 30 – 33.
316. Carter SK, Livingston RB. Plant products in cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rep.* 1976 Aug. 60 (8) : 1141 – 1156.
317. Bonadonna G. Chemotherapy strategies to improve the control of Hodgkin's disease: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.* 1982 Nov. 42 (11) : 4309 - 4320.
318. Dyke RW, Nelson RL. Phase I anti-cancer agents: vindesine (desacetyl vinblastine amide sulfate). *Cancer Treat Rev.* 1977 Jun. 4 (2) : 135 - 142.
319. Sørensen JB, Osterlind K, Hansen HH. Vinca alkaloids in the treatment of non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev.* 1987 Mar. 14 (1) : 29 - 51.
320. Legha SS. Durable complete responses in metastatic melanoma treated with interleukin-2 in combination with interferon alpha and chemotherapy. *Semin Oncol.* 1997 Feb. 24 (1 Suppl 4) : S39 - 43.
321. Balat O, Kudelka AP, Edwards CL, Verschraegen C, Kavanagh JJ. Remission of recurrent mixed germ cell tumor of the ovary after treatment with vincristine, carboplatin, fluorouracil, and ifosfamide: a case report and review of the literature. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1996. 17 (5) : 342 – 344.
322. Toso C, Lindley C. Vinorelbine: a novel vinca alkaloid. *Am J Health Syst Pharm.* 1995 Jun 15. 52 (12) : 1287 – 1304.
323. Van Dalen EC, Raphaël MF, Caron HN, Kremer LC. Treatment including anthracyclines versus treatment not including anthracyclines for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Jan 19. (1) : CD006647.

324. Jiang W, Lionberger R, Yu LX. In vitro and in vivo characterizations of PEGylated liposomal doxorubicin. *Bioanalysis*. 2011 Feb. 3 (3) : 333 - 344.
325. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *Am J Health Syst Pharm*. 2010 Dec 15. 67 (24) : 2095 - 2106.
326. Rajan A, Giaccone G. Chemotherapy for thymic tumors: induction, consolidation, palliation. *Thorac Surg Clin*. 2011 Feb. 21 (1) : 107 – 114.
327. Gurtowska N, Kloskowski T, Drewa T. Ciprofloxacin criteria in antimicrobial prophylaxis and bladder cancer recurrence. *Med Sci Monit*. 2010 Oct. 16 (10) : RA218 - 223.
328. Kahmann L, Beyer U, Mehlhorn G, Thiel FC, Strnad V, Fasching PA, Lux MP. Mitomycin C in patients with gynecological malignancies. *Onkologie*. 2010. 33 (10) : 547 - 557.
329. Fulbright JM, Huh W, Anderson P, Chandra J. Can anthracycline therapy for pediatric malignancies be less cardiotoxic? *Curr Oncol Rep*. 2010 Nov. 12 (6) : 411 - 419.
330. Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Sep-Oct. 53 (2) : 105 - 113.
331. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jun. 48 (6) : 1425 - 1438.
332. Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin Oncol*. 2009 Dec. 36 Suppl 3 : S3 - S17.

333. Oze I, Hotta K, Kiura K, Ochi N, Takigawa N, Fujiwara Y, Tabata M, Tanimoto M. Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results. *PLoS One*. 2009 Nov 13. 4 (11) : e7835.
334. Fugh-Berman A, McDonald CP, Bell AM, Bethards EC, Scialli AR. Promotional tone in reviews of menopausal hormone therapy after the Women's Health Initiative: an analysis of published articles. *PLoS Med*. 2011 Mar. 8 (3).
335. Bolla M, Fourneret P, Descotes JL. Interest of the radiotherapy-hormonotherapy association in the treatment of the high-risk prostate cancer. *Bull Cancer*. 2008 Dec. 95 (12) : 1213 - 1218.
336. Gligorov J, Azria D, Namer M, Khayat D, Spano JP. Novel therapeutic strategies combining antihormonal and biological targeted therapies in breast cancer: focus on clinical trials and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Nov. 64 (2) : 115 - 128.
337. Hadi SM, Ullah MF, Shamim U, Bhatt SH, Azmi AS. Catalytic therapy of cancer by ascorbic acid involves redox cycling of exogenous/endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Chemotherapy*. 2010. 56 (4) : 280 - 284. Epub 2010 Aug 11.
338. Gröber U. Vitamin C in complementary oncology--update 2009. *Med Monatsschr Pharm*. 2009 Jul. 32 (7) : 263 - 267.
339. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res*. 2009 Mar. 29 (3) : 809 - 815.
340. Head KA. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Altern Med Rev*. 1998 Jun. 3 (3) : 174 - 186.
341. Casciari JJ, Riordan HD, Miranda-Massari JR, Gonzalez MJ. Effects of high dose ascorbate administration on L-10 tumor growth in guinea pigs. *P R Health Sci J*. 2005 Jun. 24 (2) : 145 - 150.

342. Sekeres MA. New data with arsenic trioxide in leukemias and myelodysplastic syndromes. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007 Dec. 8 Suppl 1 : S7 - S12.
343. Hussein MA. Arsenic trioxide: a new immunomodulatory agent in the management of multiple myeloma. *Med Oncol*. 2001. 18 (4) : 239 – 242.
344. Lech PJ, Russell SJ. Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Nov. 9 (11) : 1275 – 1302.
345. Arlen PM. Prostate cancer immunotherapy: the role for sipuleucel-T and other immunologic approaches. *Oncology (Williston Park)*. 2011 Mar. 25 (3) : 261 – 262.
346. Zheng R, Shu S. Immune response to cancer and its regulation in regional lymph nodes. *J Surg Oncol*. 2011 May 1. 103 (6) : 550 – 554.
347. Characiejus D, Jacobs JJ, Pašukonienė V, Kazlauskaitė N, Danilevičiūtė V, Mauricas M, Den Otter W. Prediction of response in cancer immunotherapy. *Anticancer Res*. 2011 Feb. 31 (2) : 639 – 647.
348. Tiwari M. From tumor immunology to cancer immunotherapy: miles to go. *J Cancer Res Ther*. 2010 Oct-Dec. 6 (4) : 427 – 431.
349. Krüger C, Greten TF, Korangy F. Immune based therapies in cancer. *Histol Histopathol*. 2007 Jun. 22 (6) : 687 – 696.
350. Belda-Iniesta C, Ibáñez de Cáceres I, de Castro J. Monoclonal antibodies for medical oncology: a few critical perspectives. *Clin Transl Oncol*. 2011 Feb. 13 (2) : 84 – 87.
351. Alatrash G, Molldrem JJ. Vaccines as consolidation therapy for myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2011 Feb. 4 (1) : 37 – 50.
352. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol*. 2011 Feb. 23 (1) : 42 – 49.

353. Woelke AL, Murgueitio MS, Preissner R. Theoretical modeling techniques and their impact on tumor immunology. *Clin Dev Immunol.* 2010. 2010 : 271794.
354. Eschenburg G, Stermann A, Preissner R, Meyer HA, Lode HN. DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer. *Clin Dev Immunol.* 2010. 2010 : 169484. Epub 2010 Dec 16.
355. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010 Sep-Oct. 1 (5) : 440 – 464.
356. Nishioka Y, Aono Y, Sone S. Role of tyrosine kinase inhibitors in tumor immunology. *Immunotherapy.* 2011 Jan. 3 (1) : 107 – 116.
357. Comoli P, Zecca M, Maccario R. Immunotherapy against EBV-lymphoma in recipients of HSCT. *Expert Rev Hematol.* 2010 Oct. 3 (5) : 625 – 632.
358. Hudecek M, Anderson LD Jr, Nishida T, Riddell SR. Adoptive T-cell therapy for B-cell malignancies. *Expert Rev Hematol.* 2009 Oct. 2 (5) : 517 – 532.
359. Herberman RB. Natural killer cells and tumor immunity: 1985. *Year Immunol.* 1986. 2 : 254 – 260.
360. Forni G, Giovarelli M, Santoni A, Modesti A, Forni M. Tumour inhibition by interleukin-2 at the tumour/host interface. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Dec 17. 865 (3) : 307 – 327.
361. Fagan EA, Eddleston AL. Immunotherapy for cancer: the use of lymphokine activated killer (LAK) cells. *Gut.* 1987 Feb. 28 (2) : 113 – 116.
362. Burton RC. Natural killer cells and cancer: a review. *Aust N Z J Surg.* 1988 Oct. 58 (10) : 761 – 765.
363. Robins HI, Hugander A, Cohen JD. Whole body hyperthermia in the treatment of neoplastic disease. *Radiol Clin North Am.* 1989 May. 27 (3) : 603 – 610.

364. Subleski JJ, Wiltrout RH, Weiss JM. Application of tissue-specific NK and NKT cell activity for tumor immunotherapy. *J Autoimmun.* 2009 Nov-Dec. 33 (3-4) : 275 – 281.
365. Christophi C, Winkworth A, Muralihdaran V, Evans P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surg Oncol.* 1998 Jul-Aug. 7 (1-2) : 83 – 90.
366. Bartram Thomas. 1995. *Encyclopedia of Herbal Medicine.* Dorset: Ed Grace Publishers. England.
367. Weiss, Rudolf. 1988. *Herbal Medicine.* Translated by A.R. Meuss. Beaconsfield, England: Beaconsfield Publishers.
368. T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb. 1993. *FLORA EUROPAEA Vol. 1.*
369. Laplace, G. N. Agrios. *Plant Pathology.* (3rd Edition). 1989 : 475 – 478.
370. Newall, Carol A., Linda A. Anderson and J.D. Phillipson. 1996. *Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals.* London: The Pharmaceutical Press.
371. Steiner R. Who influenced whom? And how? a brief series of notes on E. Weiss, M. Klein (and I. Svevo) and the so-called 'origins' of 'projective and introjective identification. *Int J Psychoanal.* 1999 Apr. 80 (Pt 2) : 367 – 375.
372. Fellmer KE After care of irradiated genital carcinoma using the *Viscum album* preparation Iscador for the prevention of recurrences. *Med Klin.* 1967 Feb 24. 62 (8) : 305 – 307.
373. Gaubatz E. Life expectancy of patients with resected bronchial carcinoma and postoperative cytostatic therapy using trenimon, cealysin, and *Viscum album.* *Pneumonologie* 1973. 148 (2) : 79 – 87.

374. Leroi R. Postoperative Viscum album therapy after surgery of breast neoplasms. *Helv Chir Acta* 1977 Jun. 44 (3) : 403 – 414.
375. Hassauer W. Gutsch J. Burkhardt R. What prospects of success does Iscador therapy offer in advanced ovarian cancer? *Onkologie* 1979 Feb. 2 (1) : 28 – 36.
376. Bruseth S. Enge A. Mistletoe in the treatment of cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1993 Mar 30. 113 (9) : 1058 – 1060.
377. Bocci V. Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993 Jan–Mar. 7 (1) : 1 – 6. Review.
378. Zarkovic N, Vukovic T, Loncaric I, Miletic M, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, Sabolovic S, Konitzer M, Mang S. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm* 2001 Feb. 16 (1) : 55 – 62.
379. Zarković N, Kalisnik T, Lončarić I, Borović S, Mang S, Kissel D, Konitzer M, Jurin M, Grainza S. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth in vitro and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Biother Radiopharm* 1998 Apr. 13 (2) : 121 – 131.
380. Zarkovic N, Zarkovic K, Grainca S, Kissel D, Jurin M. The *Viscum album* preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumour-host relationship. *Anticancer Drugs* 1997 Apr. 8 Suppl 1 : S17 – 22.
381. Vester F, Nienhaus J. Cancerostatic protein components from *Viscum album*. *Experientia* 1965 Apr 15. 21 (4) : 197 – 199.
382. Vester F, Bohne L, El-Fouly M. Data on the substances contained in *Viscum album*, IV. Biological activity of individual protein fractions. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1968 Apr. 349 (4) : 495 – 511.

383. Vester F, Schweiger A, Seel A, Stoll M. Inhibitory influence of basic proteins from *Viscum album* on RNA synthesis in Yoshida ascites cells. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1968 Jun. 349 (6) : 865 – 866.
384. Luther P, Franz H, Haustein B, Bergmann KC. Isolation and characterization of mistletoe extracts (*Viscum album* L.). II. Effect of agglutinating and cytotoxic fractions on mouse ascites tumor cells. *Acta Biol Med Ger.* 1977. 36 (1) : 119 – 125.
385. Luther P, Uhlenbruck G, Reutgen H, Samtleben R, Sehrt I, Ribereau-Gayon G. Are lectins of *Viscum album* interesting tools in lung diseases? A review of recent results. *Z Erkr Atmungsorgane* 1986. 166 (3) : 247 – 256.
386. Brinck U, Korabiowska M, Bosbach R, Gabius HJ. Detection of inflammation- and neoplasia-associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. *Acta Anat (Basel)* 1998. 161 (1-4) : 219 – 233.
387. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999 May 1. 59 (9) : 2083 - 2090.
388. Park R, Kim MS, So HS, Jung BH, Moon SR, Chung SY, Ko CB, Kim BR, Chung HT. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem Pharmacol* 2000 Dec 1. 60 (11) : 1685 – 1691.
389. Mantle D, Lennard TW, Pickering AT. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React Toxicol Rev.* 2000 Aug. 19 (3) : 223 – 240.

390. Kovacs E. Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with Viscum album extract. *Biomed Pharmacother.* 2000 Jul. 54 (6) : 305 – 310.
391. Stein GM, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album* L.): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN-gamma in apoptotic cells. *Anticancer Res.* 2000 May-Jun. 20 (3A) : 1673 – 1678.
392. Frantz M, Jung ML, Ribereau-Gayon G, Anton R. Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* 2000 May. 50 (5) : 471 – 478.
393. Stein GM, Berg PA. Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res.* 1999, May 26. 4 (5) : 169 -177.
394. Timoshenko AV, Dubovskaya LV, Karvatskaya OD, Zharkov VV, André S, Gabius HJ. NO-dependent regulation of lectin- and menadione-induced H₂O₂ production by cells from pleural effusions of lung cancer patients and by immune cells. *Int J Oncol.* 1999 Apr. 14 (4) : 793 – 798.
395. Büssing A, Schaller G, Pfüller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec. 18 (6A) : 4291 – 4296.
396. Stein GM, Schietzel M, Büssing A. Mistletoe in immunology and the clinic (short review). *Anticancer Res.* 1998 Sep-Oct. 18 (5A) : 3247 – 3249.
397. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol.* 1998 Apr-May. 20 (4-5) : 163 – 172.

398. Weber K, Mengs U, Schwarz T, Hajto T, Hostanska K, Allen TR, Weyhenmeyer R, Lentzen H. Effects of a standardized mistletoe preparation on metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs. RCC Research & Consulting Company Ltd. Itingen, Switzerland. *Arzneimittelforschung* 1998 May. 48 (5) : 497 – 502.
399. Schink M. Mistletoe therapy for human cancer: the role of the natural killer cells. *Anticancer Drugs* 1997 Apr. 8 Suppl 1 : S47 - 51.
400. Stein GM, Pfüller U, Schietzel M. Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album* L.) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Res.* 1999 Jul-Aug. 19 (4B) : 2925 – 2928.
401. Stein GM, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Intracellular expression of IL-4 and inhibition of IFN-gamma by extracts from European mistletoe is related to induction of apoptosis. *Anticancer Res.* 2000 Sep-Oct. 20 (5A) : 2987 – 2994.
402. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Apr 16. (2) : CD003297.
403. Αθανασιάδης Η. Ν. «Δασική Βοτανική – Δένδρα και θάμνοι των δασών της Ελλάδας». Μέρος ΙΙ. 1986. Θεσσαλονίκη.
404. Kallistratos G, Pfau A, Timmermann A. *Z Krebsforsch.* Investigations on malignolipin. 1970 Mar 10. 73 (4) : 387 – 396.
405. Kallistratos G, Pfau A. Effect of 3,4-benzopyrene on large mammals. *Naturwissenschaften.* 1971 Apr. 58 (4) : 222.
406. Kallistratos G. Inhibition of 3,4-benzopyrene-cancerogenesis in mice through putrescine. *Naturwissenschaften.* 1974 Oct. 61 (10) : 459.
407. Kallistratos G. Prevention of 3,4-benzopyrene carcinogenesis by naturally occurring and synthetic compounds. *MMW Munch Med Wochenschr.* 1975 Mar 7. 117 (10) : 391 – 394.

408. Kallistratos G. The significance of the cis-aconitic acid for the biological inactivation of the 3,4-benzopyrene cancerogenesis (author's transl). *Experientia*. 1975 Apr 15. 31 (4) : 490 - 491.
409. Kallistratos G, Kallistratos U. Putrescine as inhibitor of 3,4-benzopyrene cancerogenesis. *Eur J Cancer*. 1975 Oct. 11 (10) : 717 – 719.
410. Kallistratos G, Fasske E. Prevention of 3,4-benzopyrene carcinogenesis in presence of putrescine. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*. 1976 Sep 24. 87 (1) : 81 – 92.
411. Kallistratos G, Fasske E. Inhibition of benzo(a)pyrene carcinogenesis in rats with vitamin C. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1980. 97 (1) : 91 – 96.
412. Kallistratos G, Donos A, Evangelou A, Fasske E. The paradoxical effect of vitamin C on benzo[a]pyrene-induced tumors and malignancy. *Naturwissenschaften*. 1984 Mar. 71 (3) : 160 – 161.
413. Kallistratos G, Evangelou A, Agnantis N, Fasske E, Karkabounas S, Donos A. Enhancement of the antineoplastic effect of anticarcinogens on benzo[a]pyrene-treated Wistar rats, in relation to their number and biological activity. *Cancer Lett*. 1994 Jul 29. 82 (2) : 153 – 165.
414. Pauling L, Anderson R, Banic S, Basu TK, Kallistratos G, Murata A, Panush R, Schmähl D, Siegel BV. Workshop on vitamin C in immunology and cancer. *Int J Vitam Nutr Res Suppl*. 1982. 23 : 209 – 219.
415. Pauling L. Effect of ascorbic acid on incidence of spontaneous mammary tumors and UV-light-induced skin tumors in mice. *Am J Clin Nutr*. 1991 Dec. 54 (6 Suppl) : 1252S - 1255S.
416. Pauling L. Vitamin C papers. *Science*. 1989 Mar 24. 243 (4898) : 1535.
417. Pauling L. Biostatistical analysis of mortality data for cohorts of cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May. 86 (10) : 3466 – 3468.

418. Pauling L, Herman ZS. Criteria for the validity of clinical trials of treatments of cohorts of cancer patients based on the Hardin Jones principle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep. 86 (18) : 6835 – 6837.
419. Pauling L, Moertel C. A proposition: megadoses of vitamin C are valuable in the treatment of cancer. *Nutr Rev*. 1986 Jan. 44 (1) : 28 – 32.
420. Pauling L, Nixon JC, Stitt F, Marcuson R, Dunham WB, Barth R, Bensch K, Herman ZS, Blaisdell BE, Tsao C, et al. Effect of dietary ascorbic acid on the incidence of spontaneous mammary tumors in RIII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Aug. 82 (15) : 5185 – 5189.
421. Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Sep. 75 (9) : 4538 – 4542.
422. Cameron E, Pauling L. Experimental studies designed to evaluate the management of patients with incurable cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec. 75 (12) : 6252.
423. Cameron E, Pauling L, Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: a review. *Cancer Res*. 1979 Mar. 39 (3) : 663 – 681.
424. Karkabounas, S., Sofis, G., Evangelou, A. Implication of free radicals for platelet aggregation; Antiplatelet effects of free radical scavengers, ex vivo. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition* 10 (2), pp. 84 – 91.
425. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980. 492 : 153 – 168.
426. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010 Dec 1. 49 (11) : 1603 – 1616.

427. Menna C, Olivieri F, Catalano A, Procopio A. Lipoxygenase inhibitors for cancer prevention: promises and risks. *Curr Pharm Des.* 2010. 16 (6) : 725 – 733.
428. Zordoky BN, El-Kadi AO. Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab.* 2009 Feb. 10 (2) : 164 – 178.
429. Κακουλίδης Ιωάννης : Ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων από αντιοξειδωτικούς αναστολείς της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. 1994 Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
430. Σόφης Γεώργιος : Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών. 1992. Διδακτορική διατριβή, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
431. Duong Van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to the cytotoxic effects of *Viscum album* extracts of different origin. *Chemotherapy.* 2003 Dec. 49 (6) : 298 – 302.
432. Kienle GS, Kiene H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther.* 2010 Jun. 9 (2) : 142 – 157.
433. Büssing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb. 19 (1A) : 23 – 28.
434. Tabiasco J, Pont F, Fournié JJ, Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2002 May. 269 (10) : 2591 – 2600.

435. Büssing A, Stein GM, Pfüller U, Schietzel M. Differential binding of toxic lectins from *Viscum album* L., ML I and ML III, to human lymphocytes. *Anticancer Res.* 1999 Nov-Dec. 19 (6B) : 5095 – 5099.
436. Hülsen H, Kron R, Mechelke F. Influence of *Viscum album* preparations on the natural killer cell-mediated cytotoxicity of peripheral blood. *Naturwissenschaften.* 1989 Nov. 76 (11) : 530 – 531.
437. Mueller EA, Hamprecht K, Anderer FA. Biochemical characterization of a component in extracts of *Viscum album* enhancing human NK cytotoxicity. *Immunopharmacology.* 1989 Jan-Feb. 17 (1) : 11 – 18.
438. Braedel-Ruoff S. Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials. *Forsch Komplementmed.* 2010 Apr. 17 (2) : 63 – 73.
439. Lebedev KA. Homeostasis of adult stem cells and carcinogenesis. *Fiziol Cheloveka.* 2010 Nov-Dec. 36 (6) : 5 – 13.
440. Driver JA, Lu KP. Pin1: a new genetic link between Alzheimer's disease, cancer and aging. *Curr Aging Sci.* 2010 Dec. 3(3) : 158 – 165.
441. Gross L. Inhibition of the development of tumors or leukemia in mice and rats after reduction of food intake. Possible implications for humans. *Cancer.* 1988 Oct 15. 62 (8) : 1463 – 1465.
442. Imaoka T, Nishimura M, Iizuka D, Daino K, Takabatake T, Okamoto M, Kakinuma S, Shimada Y. Radiation-induced mammary carcinogenesis in rodent models: what's different from chemical carcinogenesis? *J Radiat Res (Tokyo).* 2009 Jul. 50 (4) : 281 – 293.
443. Le Guiner C, Stieger K, Snyder RO, Rolling F, Moullier P. Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther.* 2007.
444. De Jong WH, Kroese ED, Vos JG, Van Loveren H. Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol Sci.* 1999 Aug. 50 (2) : 214 – 220.

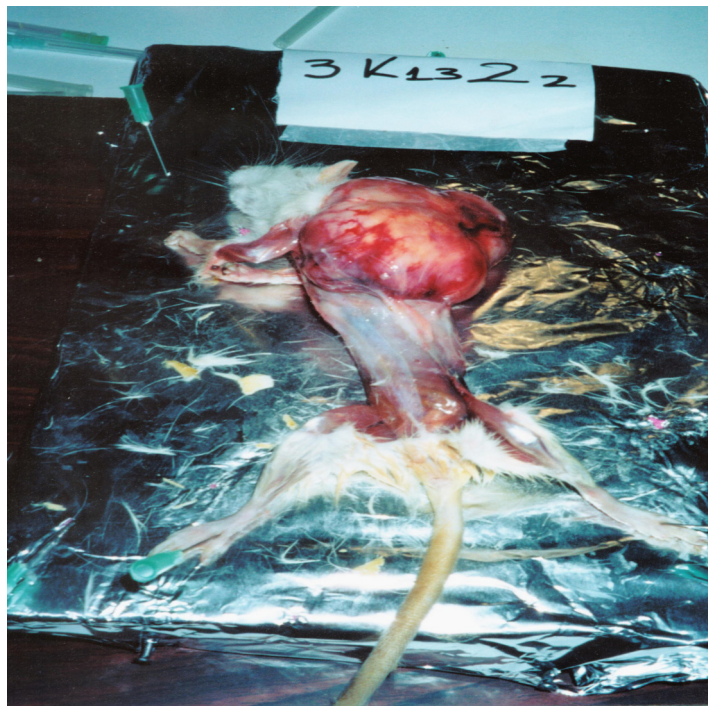
445. Carfi' M, Gennari A, Malerba I, Corsini E, Pallardy M, Pieters R, Van Loveren H, Vohr HW, Hartung T, Gribaldo L. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology*. 2007 Jan 5. 229 (1-2) : 11 – 22.
446. Cantrill RC, Ells GW, DeMarco AC, Horrobin DF. Mechanisms of the selective cytotoxic actions of certain essential fatty acids. *Adv Exp Med Biol*. 1997. 400A : 539 – 544.
447. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005 Aug. 15 (4) : 316 – 328.
448. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ*. 1999. (150) : 17 – 27.
449. Τολιόπουλος Ιωάννης. Ο ρόλος των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των αντιοξειδωτικών στον καρκίνο. Διδακτορική διατριβή, 2006, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
450. Θωμάς Χριστόφορος. Μελέτη των επιδράσεων αντιοξειδωτικών ουσιών στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων: οι δράσεις του ασκορβικού οξέος στον κυτταρικό κύκλο. Διδακτορική διατριβή, 2004, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ IN VIVO
ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

In vivo ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ ΕΠΩΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba* ΚΑΙ ΕΓΧΥΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ W1STAR.



Φωτογραφία 1: Χαρακτηριστικό ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), πριν ξεκινήσει η νεκροτομική διαδικασία.



Φωτογραφία 2: Το ίδιο ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), μετά την αφαίρεση του δέρματος, όπου διακρίνεται χαρακτηριστικά, ο μεγάλος όγκος λειομυοσαρκώματος, στη περιοχή της ράχης.



Φωτογραφία 3: Το ίδιο ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), μετά την απομάκρυνση του όγκου λειομυοσαρκώματος, από το σώμα του επίμου.



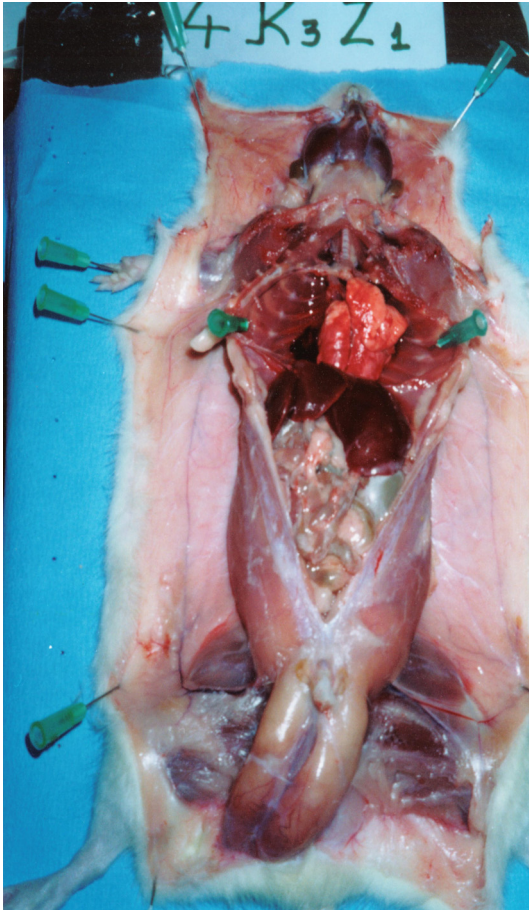
Φωτογραφία 4: Το ίδιο ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), ανοιγμένο εσωτερικά, όπου διακρίνεται ένα μόρφωμα στο ήπαρ και σαφής επηρεασμός των σπλάχνων του επίμου, κυρίως στη θωρακική κοιλότητα.



Φωτογραφία 5: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με χαρακτηριστικά μικρή ανάπτυξη όγκου στη περιοχή της ράχης, συγκριτικά με αυτόν που αναπτύχθηκε στα ζώα της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.).

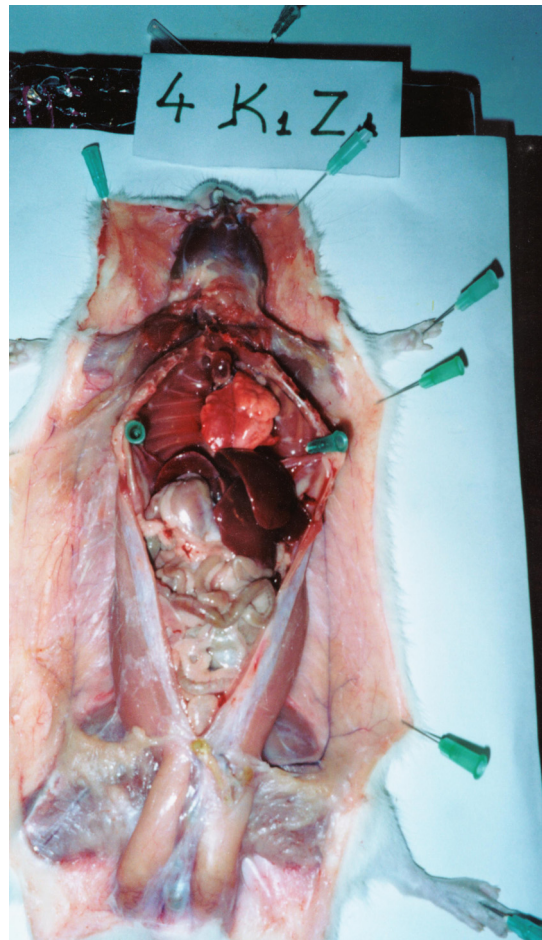
Φωτογραφία 6: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με πολύ μικρή ανάπτυξη όγκου στη περιοχή της αριστερής μασχάλης, συγκριτικά με αυτόν που αναπτύχθηκε στα ζώα της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.).





Φωτογραφία 7: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο. Θ.), του ίδιου πειράματος, χωρίς εμφανή προσβολή μακροσκοπικά (απουσία όγκου) και με φυσιολογική εμφάνιση των σπλάχνων του ζώου.

Φωτογραφία 8: Άλλο ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο. Θ.), του ίδιου πειράματος, χωρίς εμφανή προσβολή μακροσκοπικά (απουσία όγκου) και με φυσιολογική εμφάνιση των σπλάχνων του ζώου.



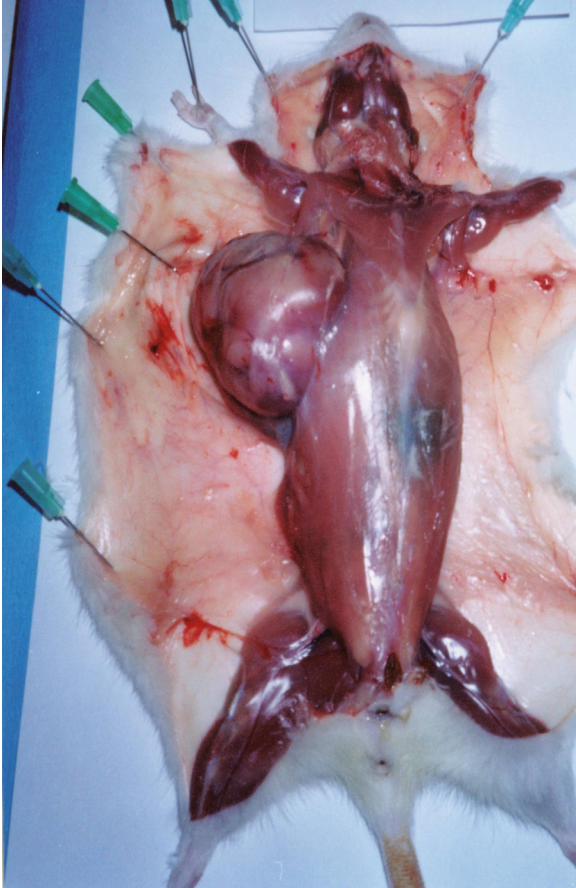
**In vivo ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ *Viscum album* + *Abies alba*
ΕΠΙ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ WISTAR ΠΟΥ ΑΝΕΠΤΥΞΑΝ ΟΓΚΟΥΣ
ΜΕ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΥΓΓΕΝΟΥΣ
ΕΠΙΜΥΟΣ.**



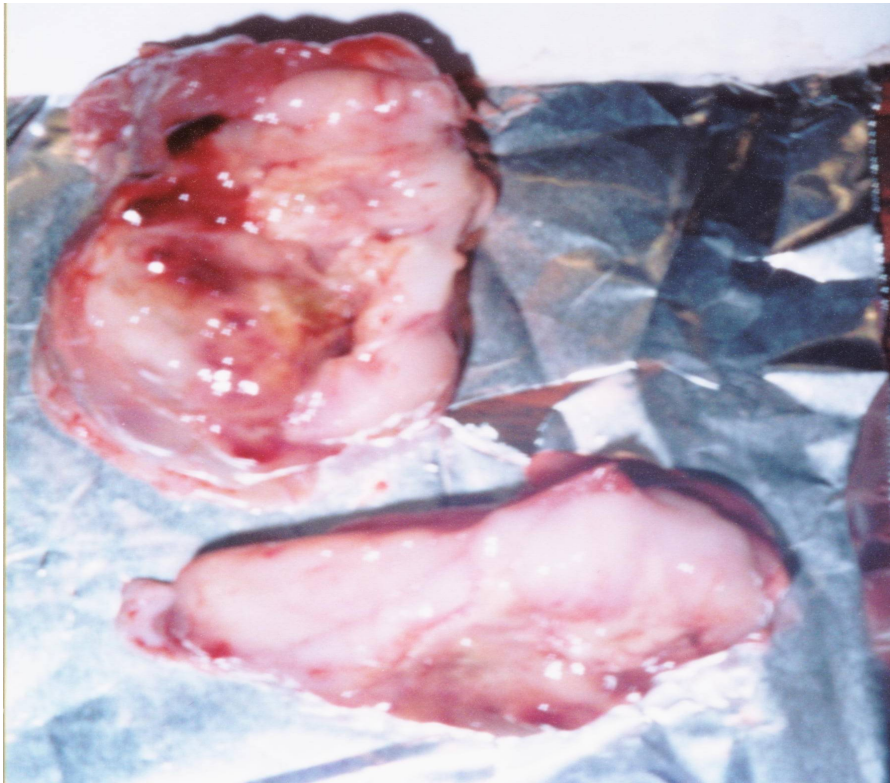
Φωτογραφία 9: Χαρακτηριστικό ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), με μεγάλη ανάπτυξη όγκου (LMS) στη περιοχή της ράχης και πολύ άσχημη εμφάνισή του μακροσκοπικά.

Φωτογραφία 10: Άλλο ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) του ίδιου πειράματος, με χαρακτηριστικά μεγάλη ανάπτυξη όγκου (LMS) στη περιοχή της ράχης και της αριστερής ωμοπλάτης του επίμυ.





Φωτογραφία 11: Άλλο ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) του ίδιου πειράματος, με μεγάλη ανάπτυξη όγκου λειομυοσαρκώματος.



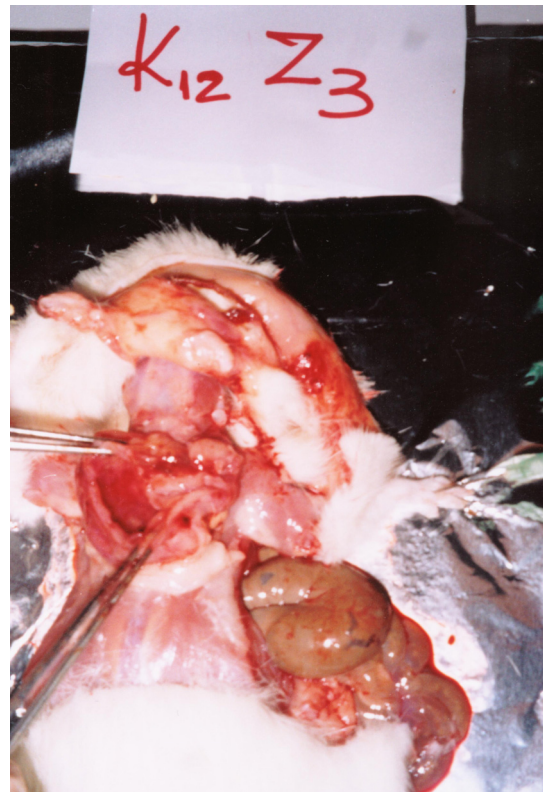
Φωτογραφία 12: Αποχωρισμένος όγκος λειομυοσαρκώματος από το σώμα επίμυ που ανήκει στην Ομάδα Ελέγχου και τεμαχισμένος, όπου διακρίνεται η μεγάλη του συνεκτικότητα.

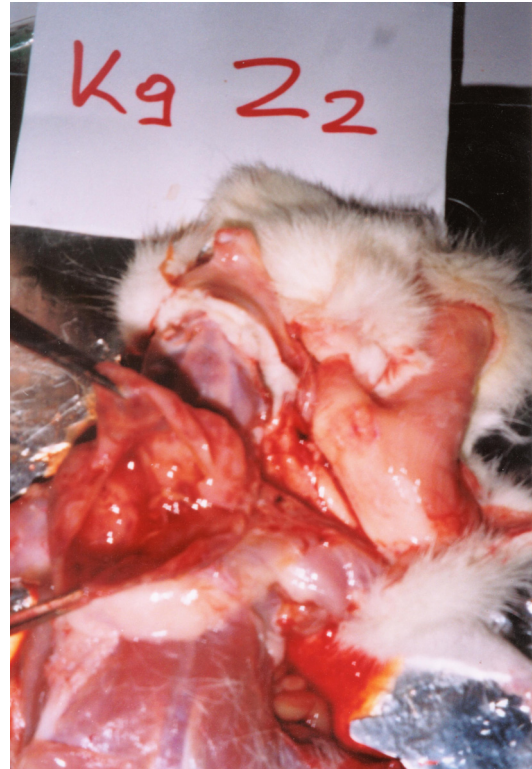
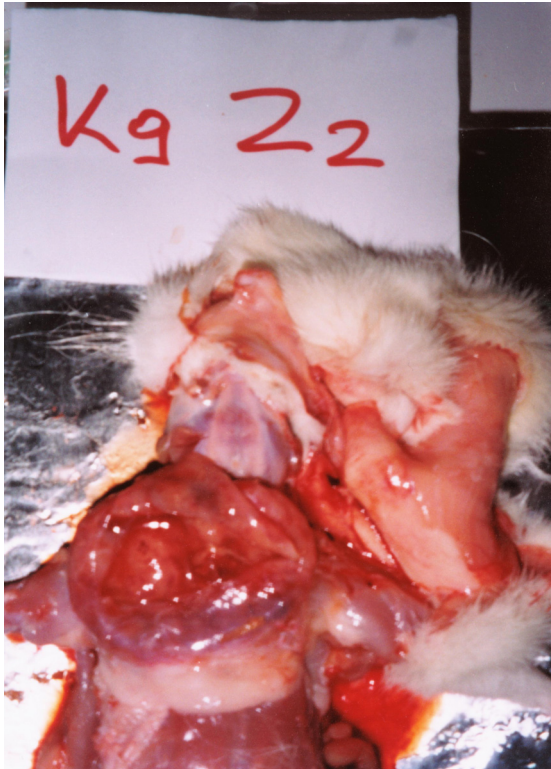


Φωτογραφία 13:

Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με χαρακτηριστική σπηλαίωση του (LMS) όγκου (έχει χάσει πλήρως τη συνεκτικότητά του).

Φωτογραφία 14: Άλλο ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με την ίδια χαρακτηριστική σπηλαίωση του όγκου λειομυοσαρκώματος.

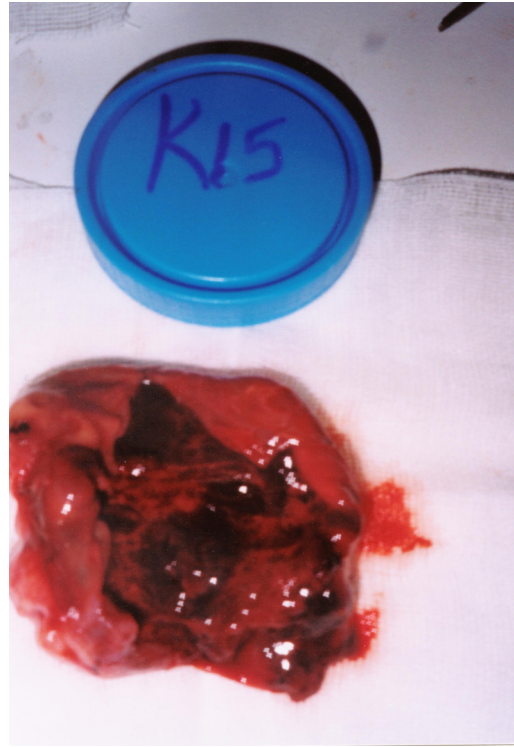
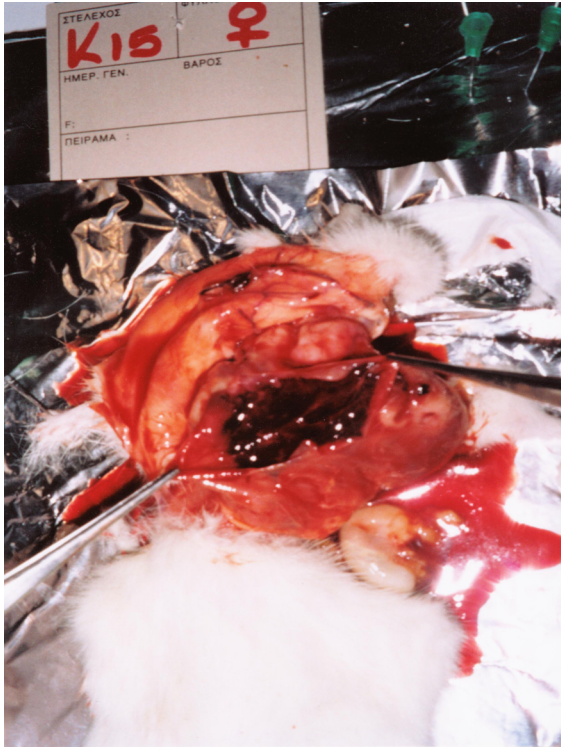




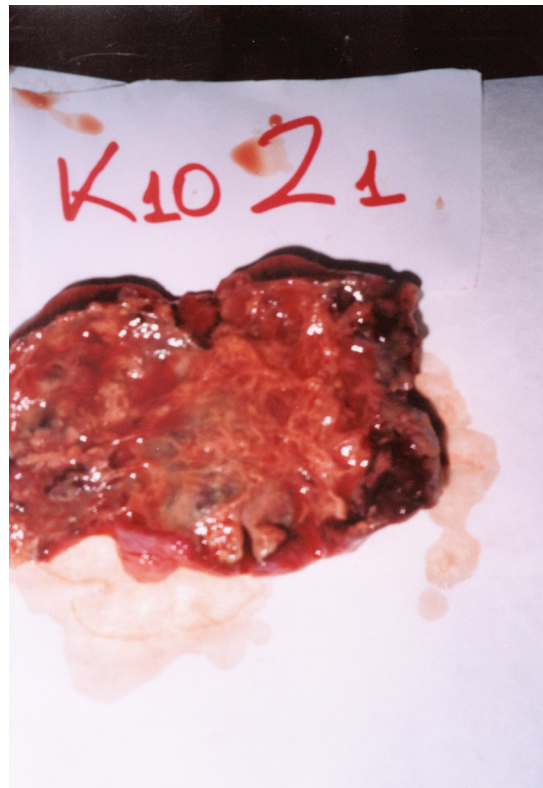
Φωτογραφίες 15 & 16: Άλλο ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, στο οποίο εμφανίζεται πάλι η χαρακτηριστική σπηλαιώση του όγκου (όγκος αιμορραγικός και υδαρής).



Φωτογραφία 17: Ένα ακόμα ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με ανάλογη εμφάνιση.

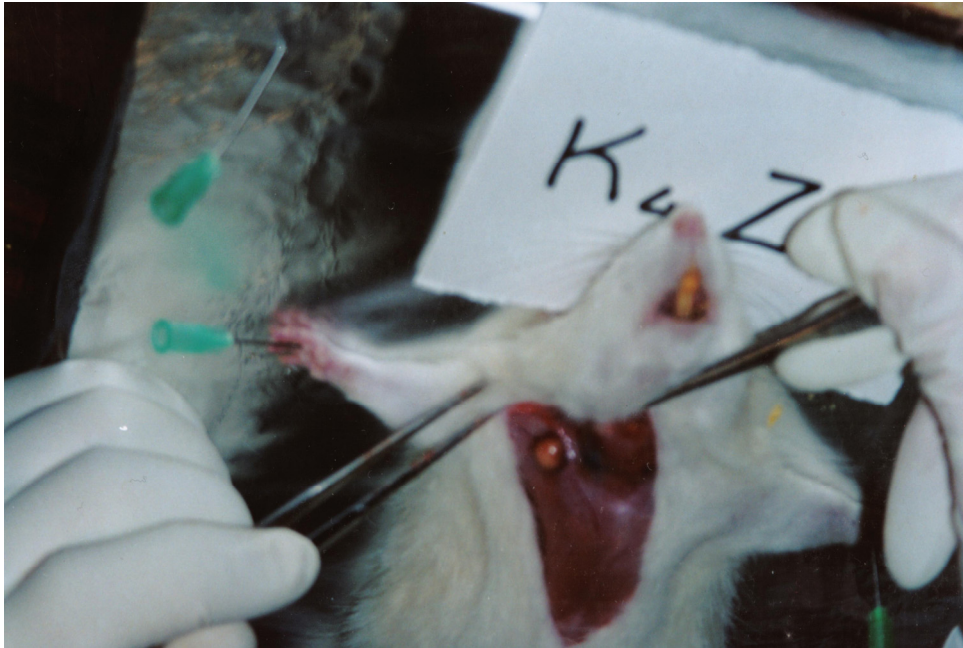


Φωτογραφίες 18 και 19: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.), του ίδιου πειράματος, με εντυπωσιακή καταστροφή του λειομυοσαρκωματικού όγκου (σπηλαίωση), όπως διακρίνεται χαρακτηριστικά προτού αποχωριστεί από το σώμα του ζώου (αριστερά) και μετά την αποχώρησή του (δεξιά).

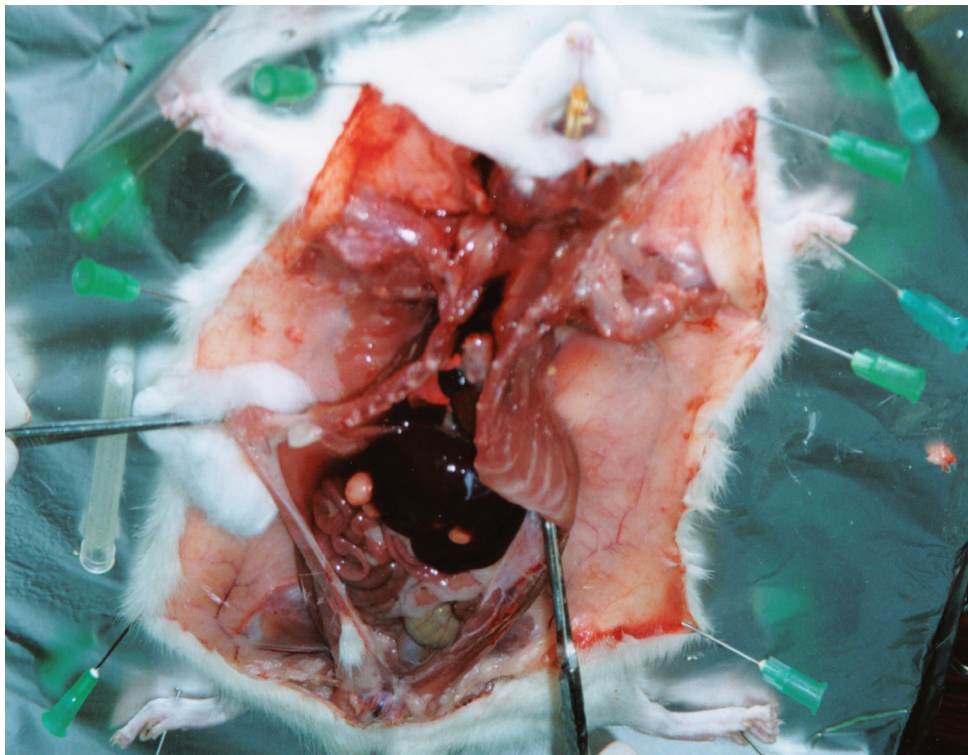


Φωτογραφίες 20 και 21: Ανάλογη περίπτωση ζώου της Ομάδας Θεραπείας (Ο. Θ.) του ίδιου πειράματος, όπου ενώ ο όγκος προτού αποχωριστεί από το ζώο έδειχνε συνεκτικός (αριστερά), μετά τον αποχωρισμό και τεμαχισμό του (δεξιά), αποδείχθηκε διαλυμένος, σαν μία κύστη που έσκασε.

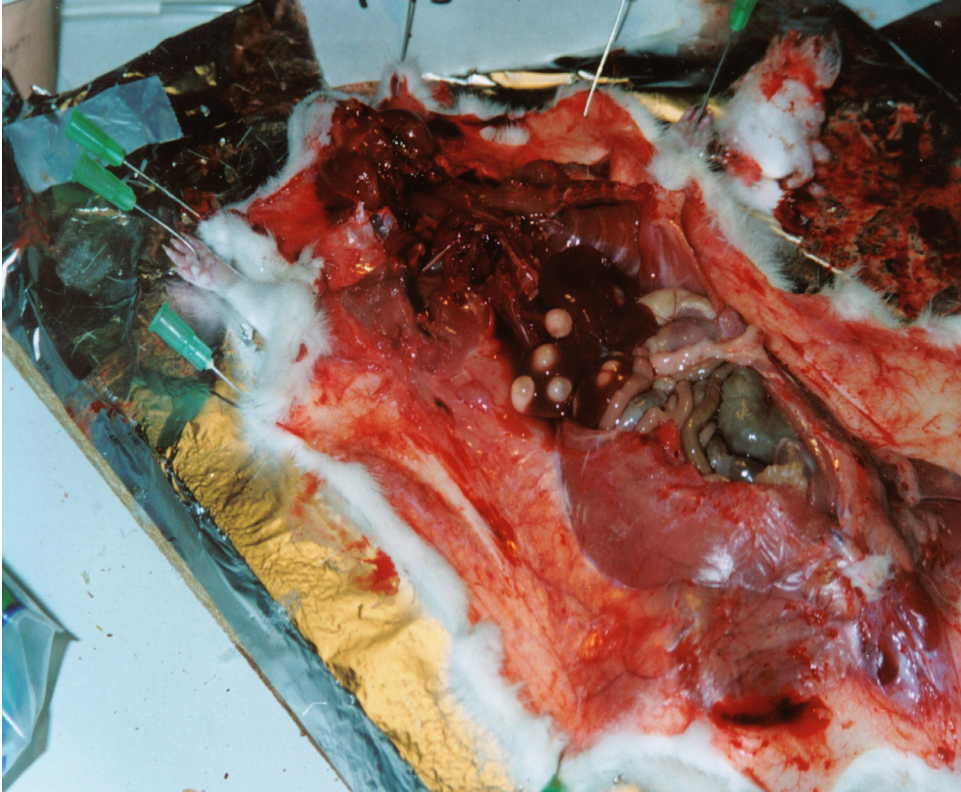
In Vivo ΠΕΙΡΑΜΑ ΟΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR.



Φωτογραφία 22: Ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) όπου κατά την έναρξη της νεκροτομής, παρατηρήθηκε μικρό μόρφωμα επί του στερνοκλειδομαστοειδούς μυός.



Φωτογραφία 23: Ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) όπου παρατηρούνται ευδιάκριτα τρία μορφώματα στη περιοχή του ήπατος.



Φωτογραφία 24: Άλλο ζώο της Ομάδας Ελέγχου του ίδιου πειράματος, όπου παρατηρούνται ευδιάκριτα έξι μορφώματα στη περιοχή του ήπατος.



Φωτογραφία 25: Ήπαρ αποχωρισμένο από ζώο της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) του ίδιου πειράματος, με χαρακτηριστική προσβολή (τρία ευδιάκριτα μορφώματα) ανάλογη των προηγούμενων ζώων.



Φωτογραφία 26: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο. Θ.), του ίδιου πειράματος, χωρίς εμφανή προσβολή μακροσκοπικά (ήπαρ καθαρό) και με φυσιολογική εμφάνιση των σπλάχνων του ζώου.

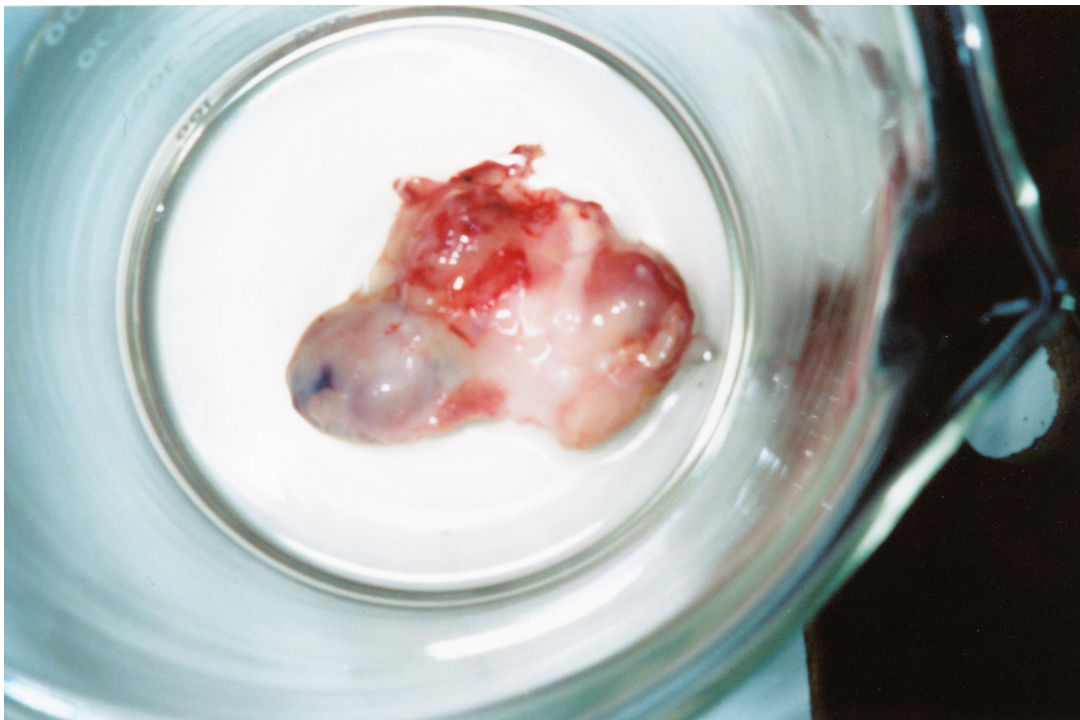


Φωτογραφία 27: Άλλο ζώο της Ομάδας Θεραπείας, του ίδιου πειράματος, σε πολύ καλή κατάσταση, χωρίς εμφανή προσβολή μακροσκοπικά.

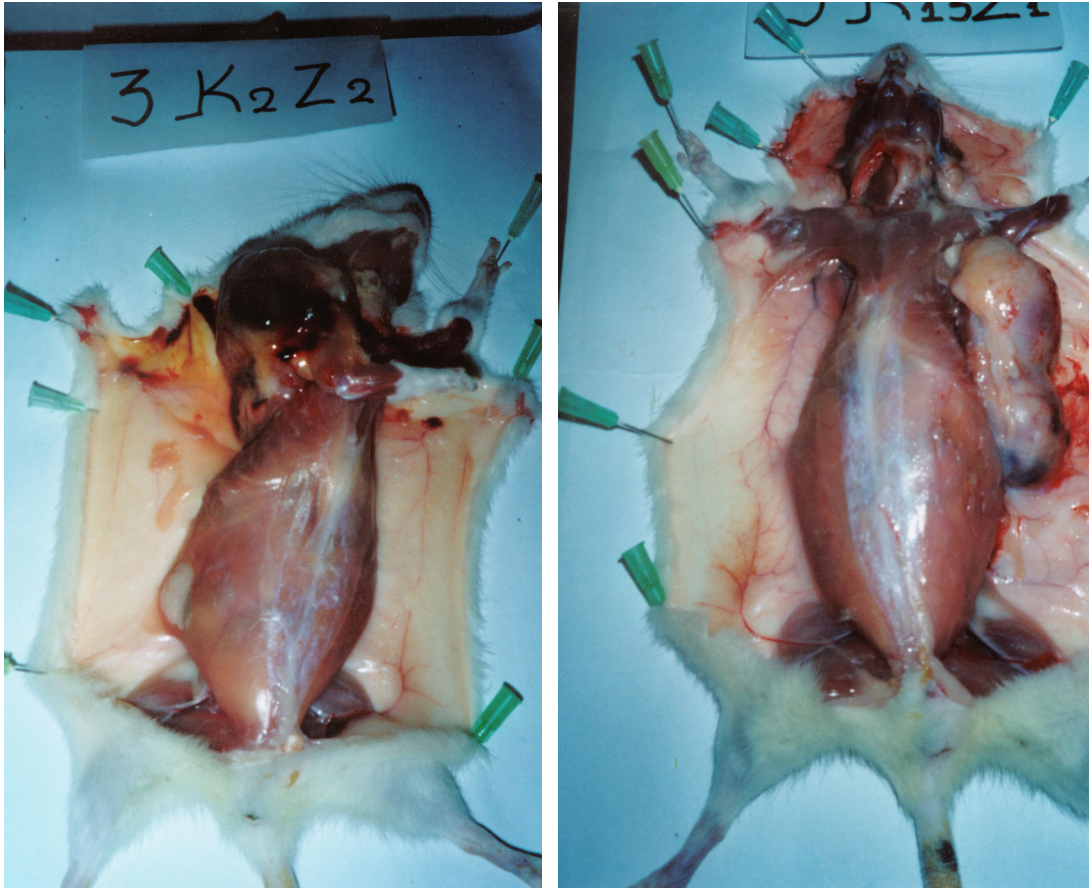
In vivo ΠΕΙΡΑΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ *Viscum album* + *Abies alba* ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ WISTAR ΠΟΥ ΚΑΤΕΣΤΗΣΑΝ ΚΑΡΚΙΝΟΠΑΘΕΙΣ ΜΕΣΩ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ Β[α]Ρ.



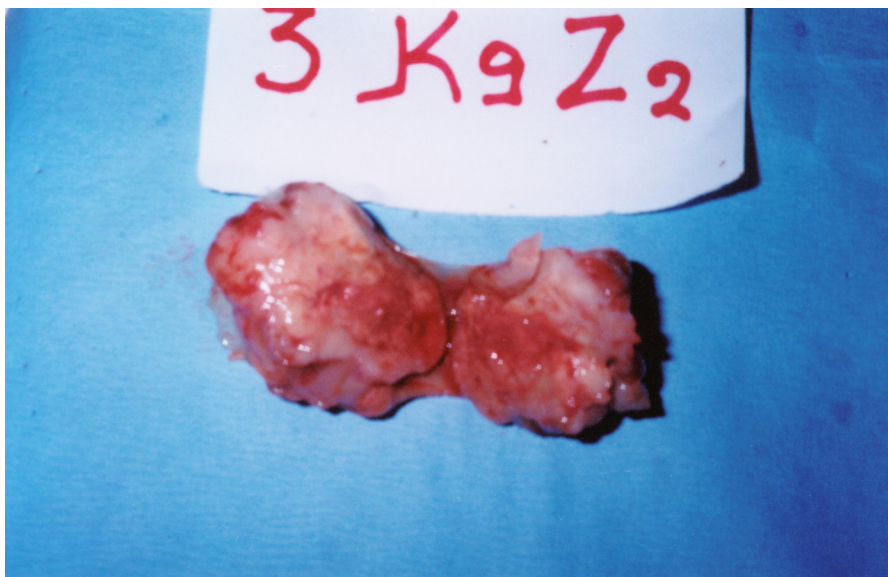
Φωτογραφία 28: Επίμυες Wistar της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), με εμφανή την ανάπτυξη όγκου στη περιοχή της ράχης, μετά την έγχυση Β[α]Ρ.



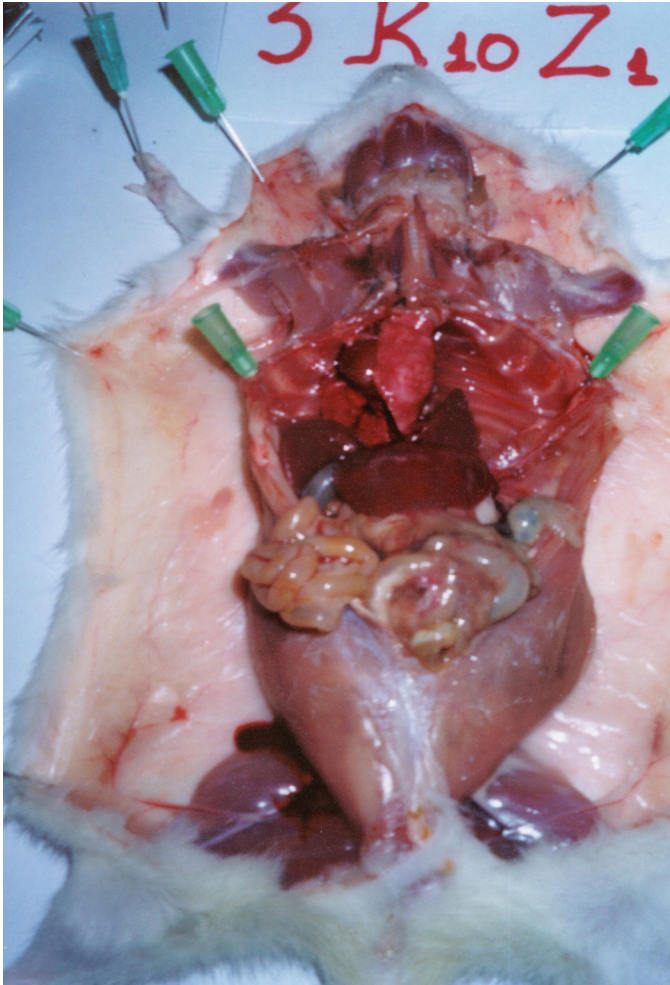
Φωτογραφία 29: Αποχωρισμένος όγκος επίμυος της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) του ίδιου πειράματος, με συνεκτικότητα και ακανόνιστη ανάπτυξη, από ζώο το οποίο πέθανε νωρίς, πριν τη λήξη του πειράματος.



Φωτογραφίες 30 και 31: Χαρακτηριστική εμφάνιση ζώων της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.) του ίδιου πειράματος, με μεγάλους και καλά αναπτυγμένους όγκους, που δημιουργήθηκαν από την έγχυση Β[α]Ρ. Τα ζώα κατά τη νεκροτομική διαδικασία εμφανίστηκαν σε πολύ άσχημη κατάσταση.



Φωτογραφία 32: Αποχωρισμένος όγκος επίμυος της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.) του ίδιου πειράματος, με συνεκτικότητα αλλά με πολύ μικρότερες διαστάσεις, συγκριτικά με τους όγκους που δημιουργήθηκαν στα ζώα της Ομάδας Ελέγχου (Ο.Ε.), όπως διακρίνεται παραπάνω.

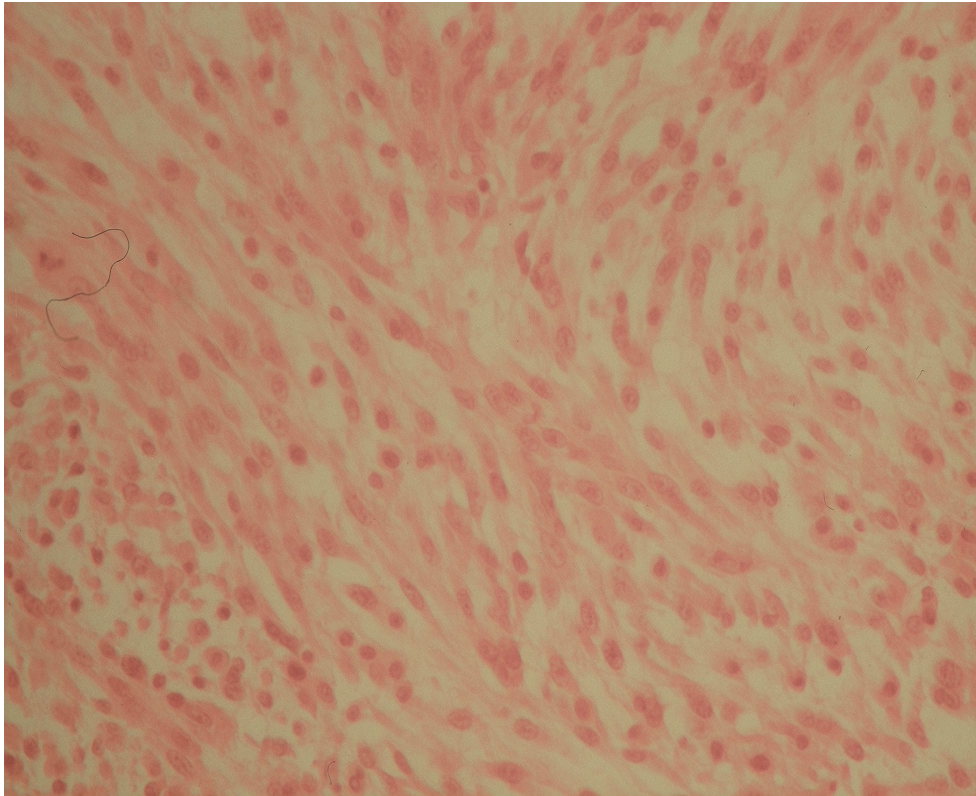


Φωτογραφία 33: Ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.) του ίδιου πειράματος το οποίο δεν ανέπτυξε όγκο, παρά την έγχυση Β[α]Ρ, το οποίο ήταν σε πολύ καλή κατάσταση και χωρίς εμφανείς προσβολές.

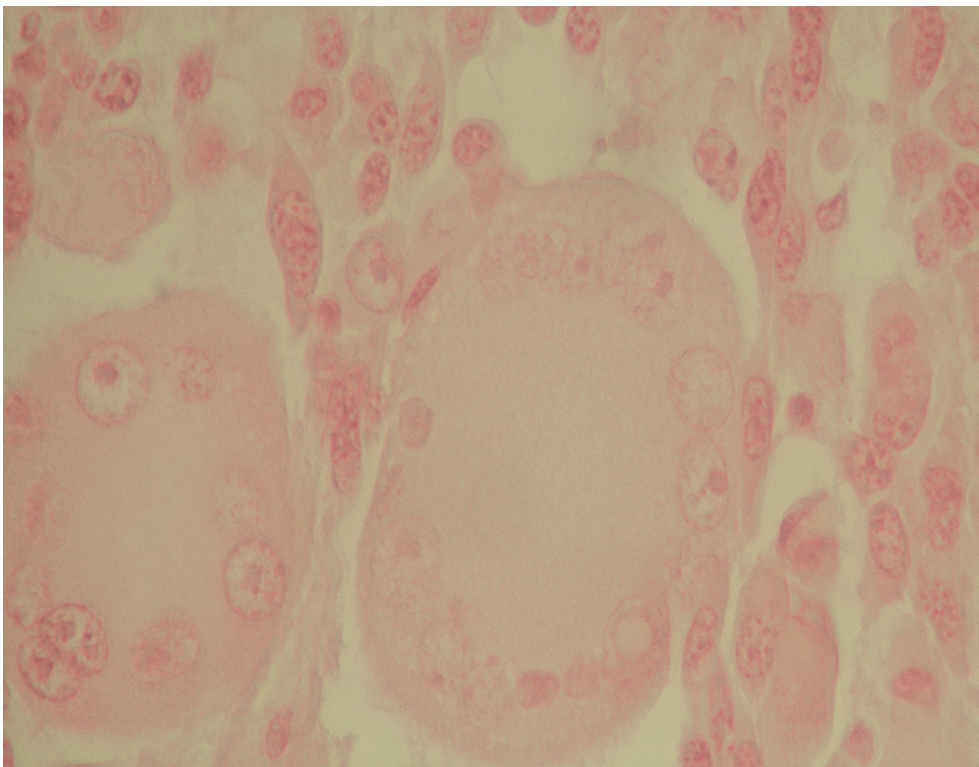
Φωτογραφία 34: Άλλο ζώο της Ομάδας Θεραπείας (Ο.Θ.) του ίδιου πειράματος το οποίο δεν ανέπτυξε όγκο, παρά την έγχυση Β[α]Ρ.



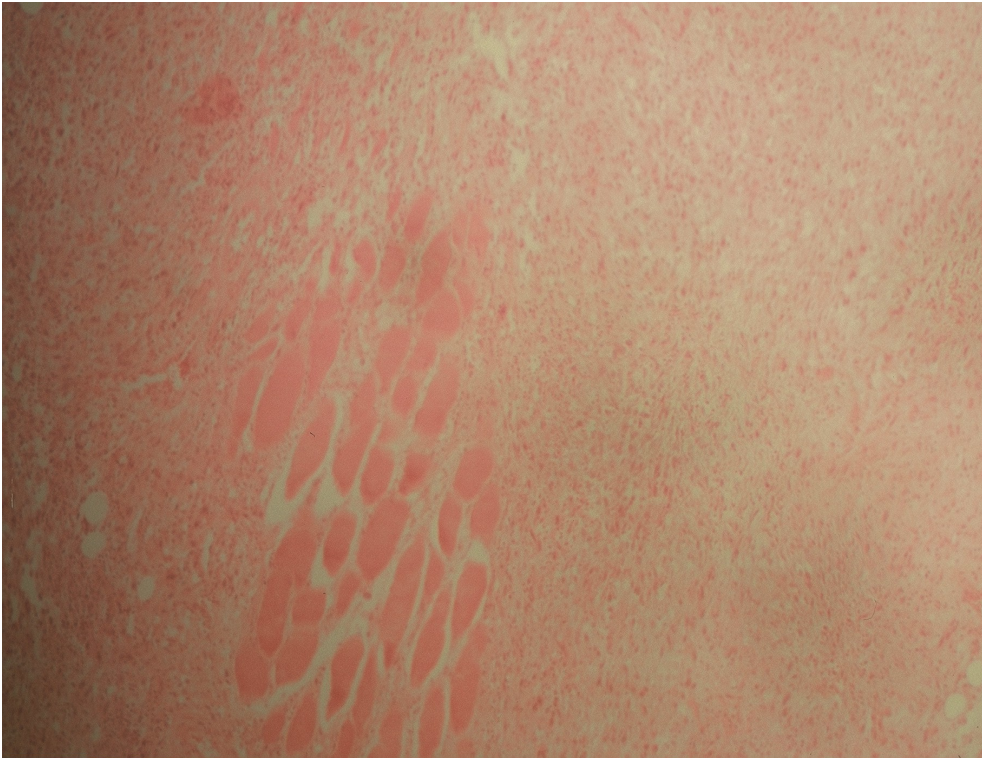
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ
ΕΠΙΜΥΩΝ WISTAR



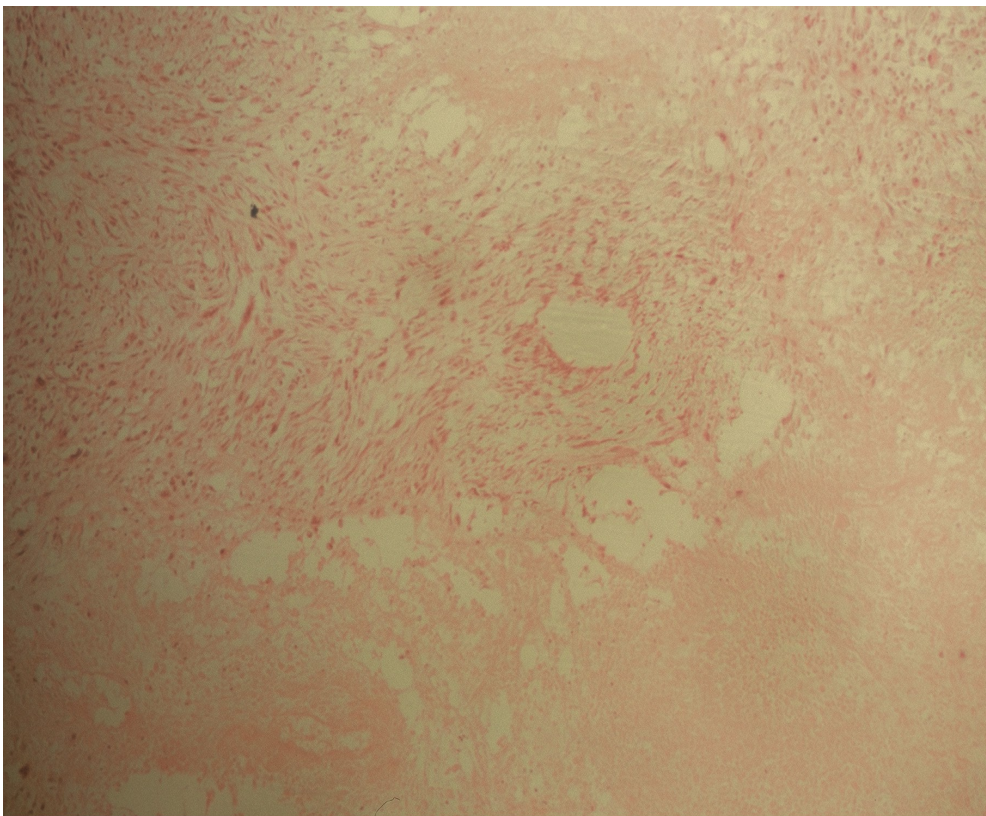
Φωτογραφία 35: Ατρακτοκυτταρικός – Ιστιοκυτταρικός όγκος – GII.



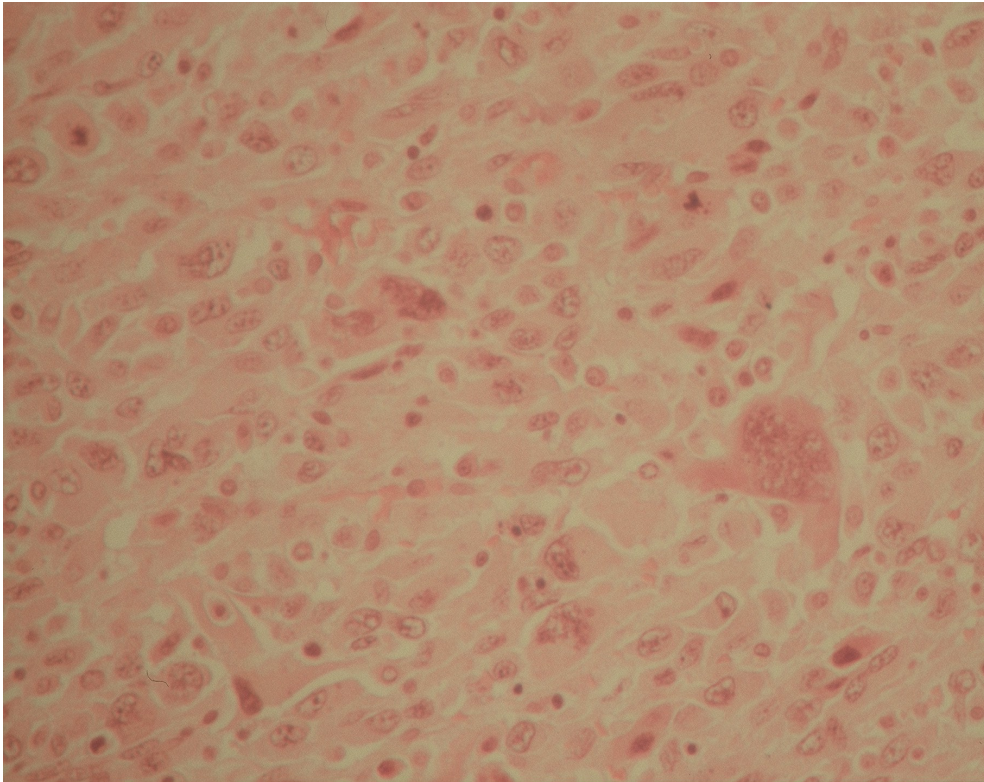
Φωτογραφία 36: Ατρακτοκυτταρικός όγκος – GIII.



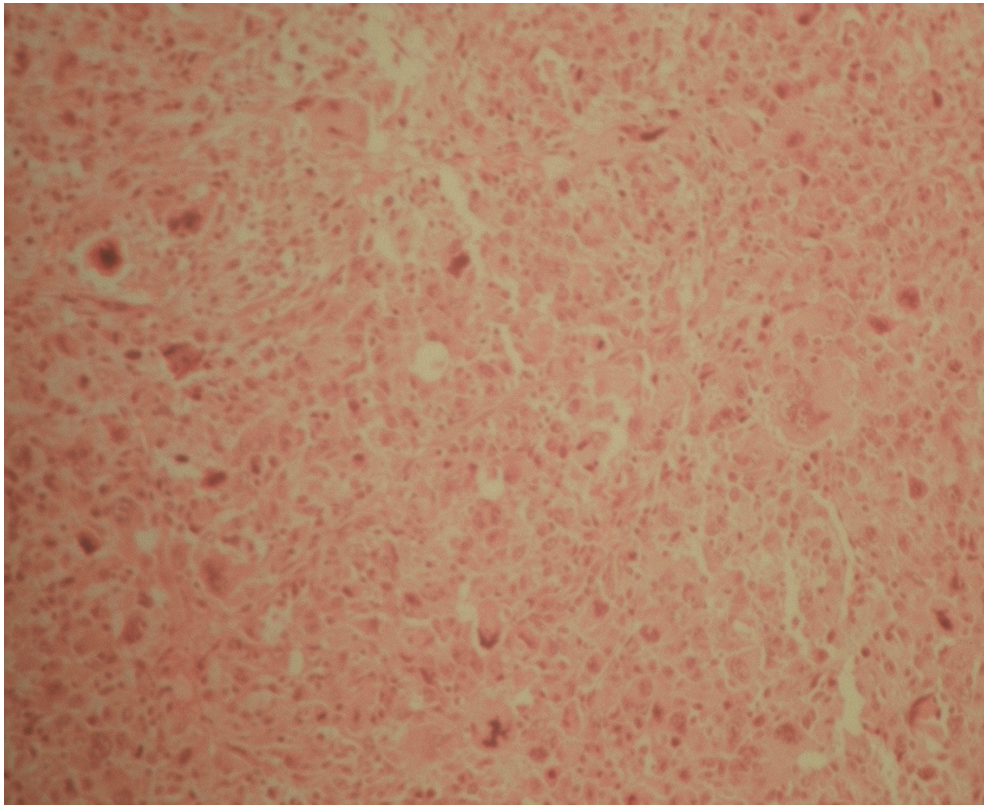
Φωτογραφία 37: Ατρακτοκυτταρικός όγκος – Διήθηση μυών - GII.



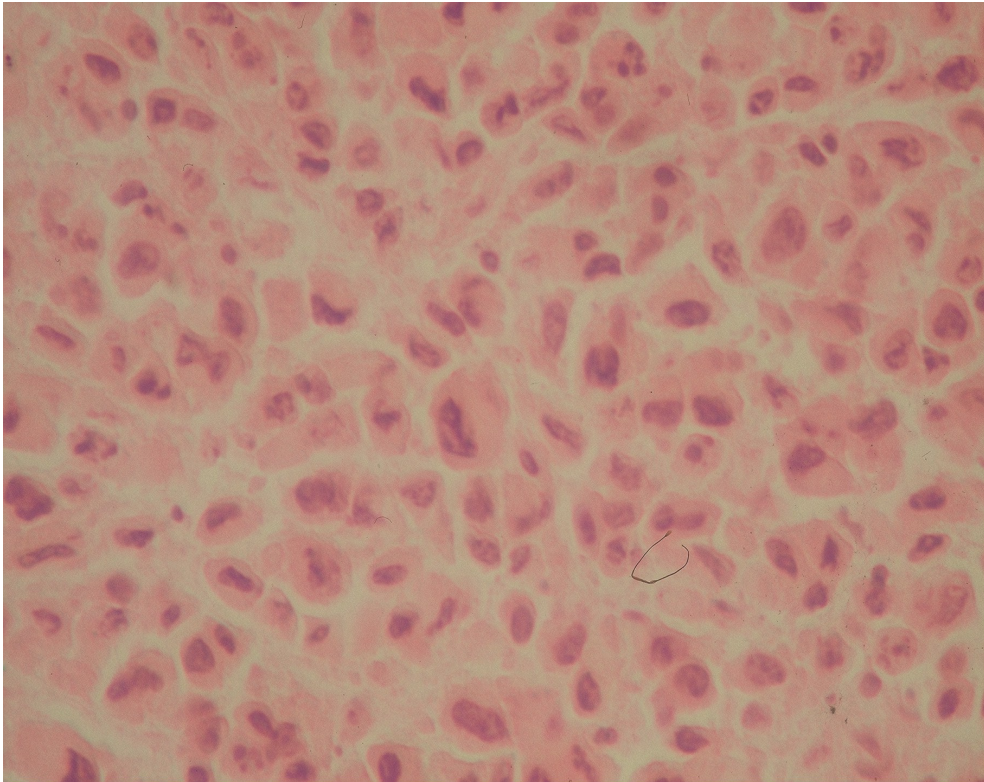
Φωτογραφία 38: Ατρακτοκυτταρικός όγκος – Νέκρωση - GIII.



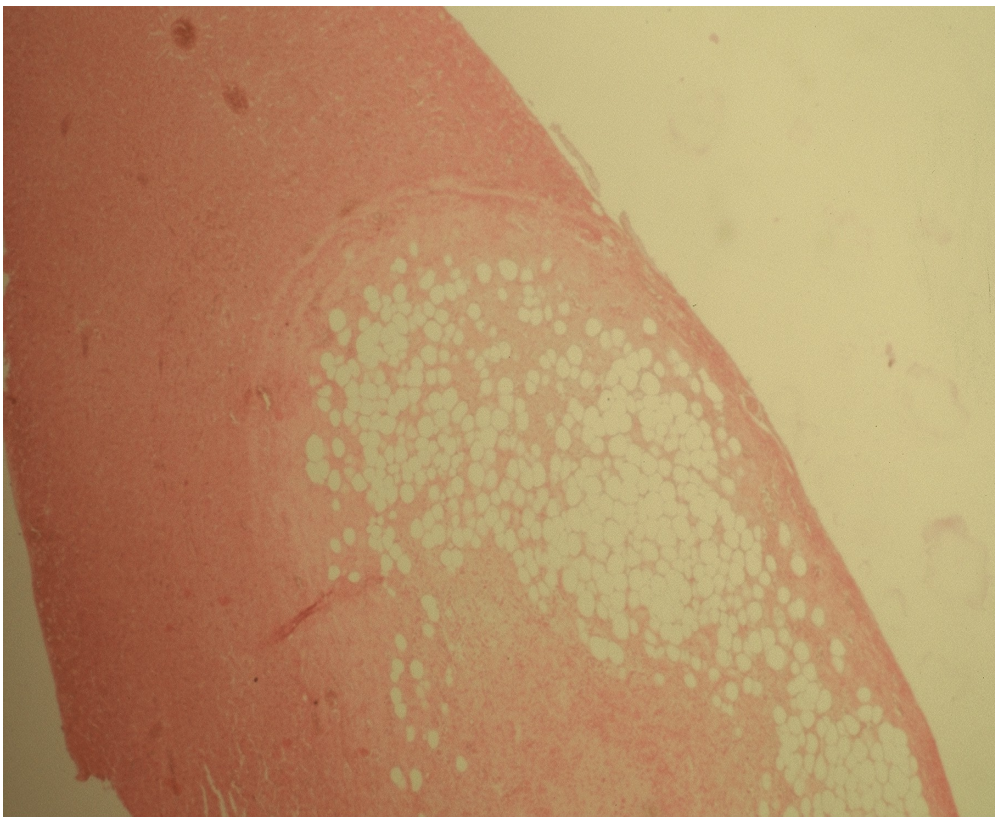
Φωτογραφία 39: Ατρακτοκυτταρικός όγκος – Ιστοκύττωμα - GIII.



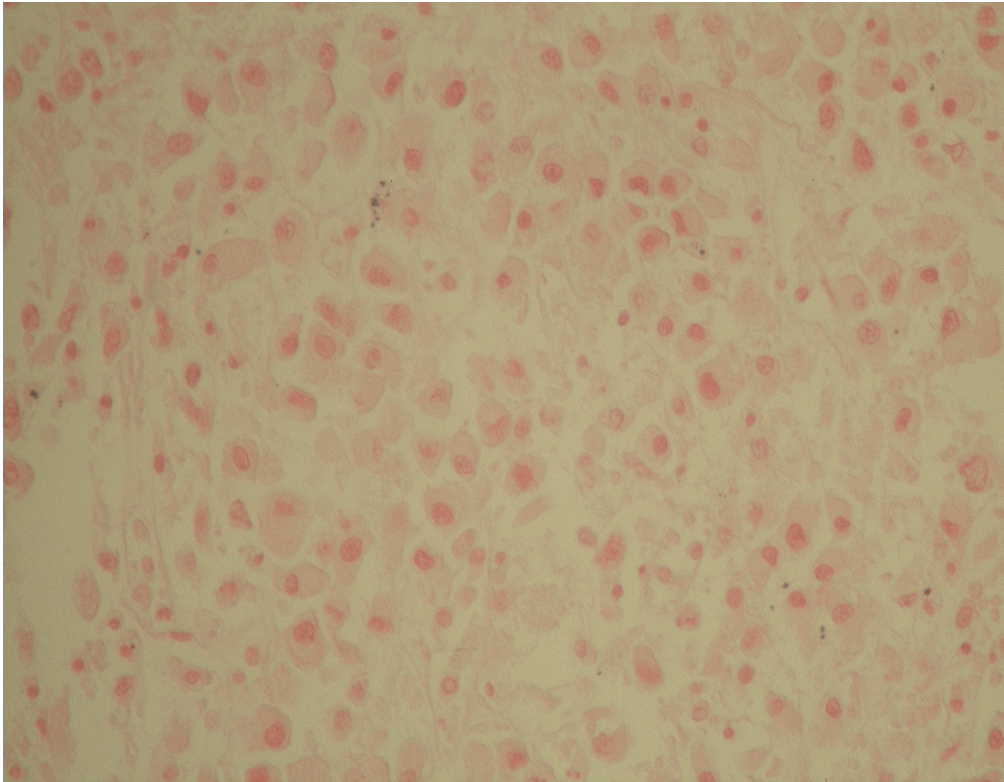
Φωτογραφία 40: Επιθηλιόμορφο πολύμορφο Ιστοκύττωμα - GIII.



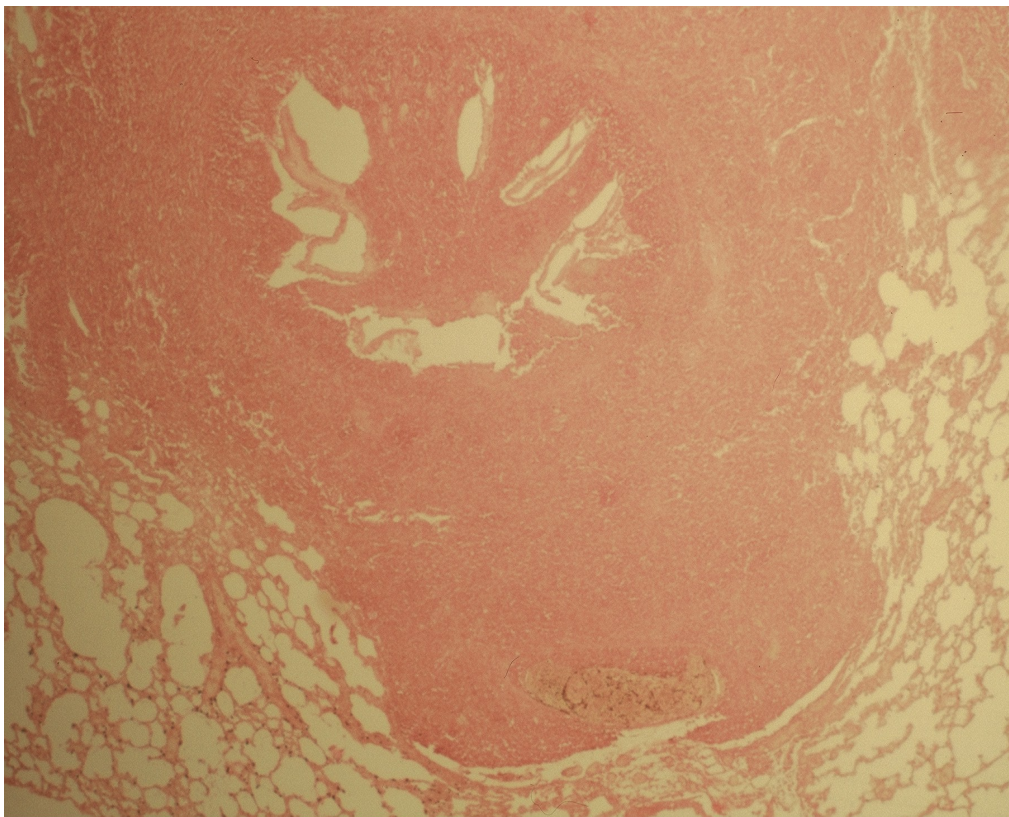
Φωτογραφία 41: Επιθηλιόμορφος όγκος - GIII.



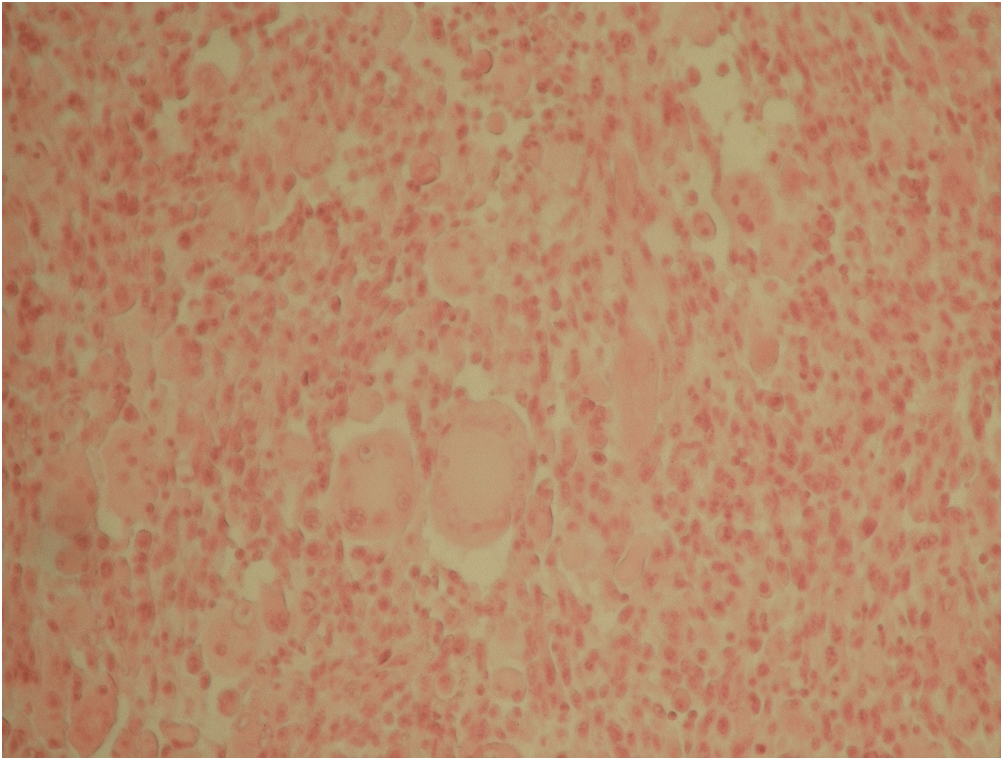
Φωτογραφία 42: Ήπαρ – Λιπώδης εκφύλιση.



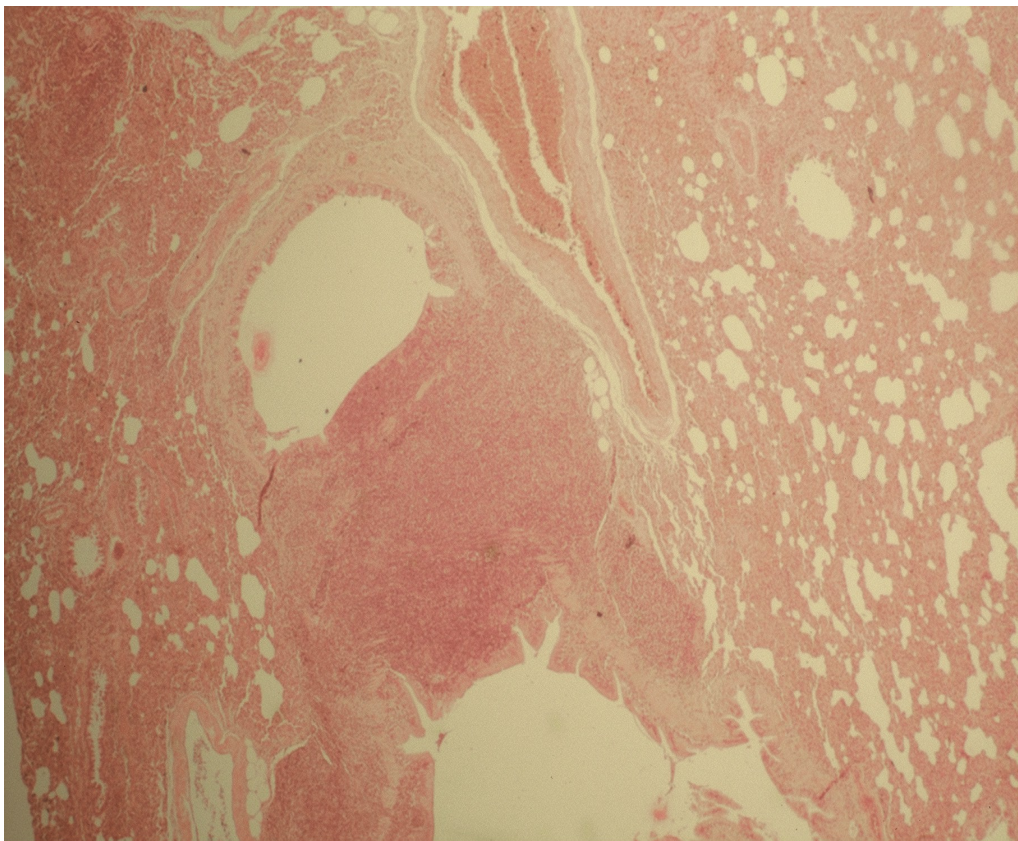
Φωτογραφία 43: Ινοσάρκωμα - GII.



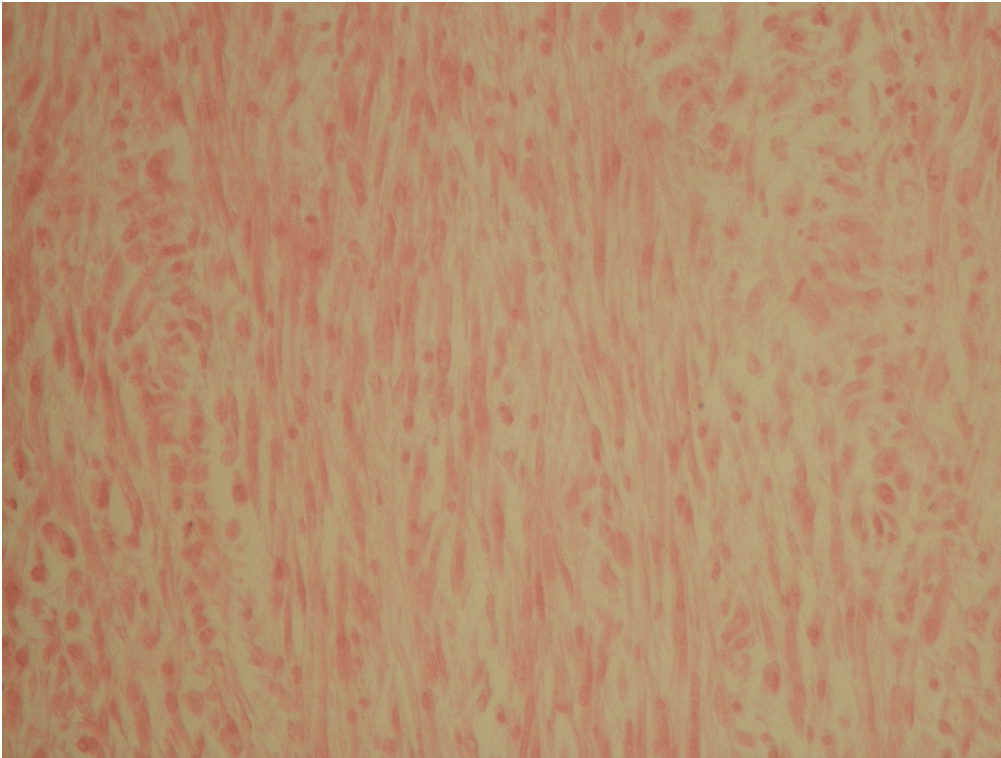
Φωτογραφία 44: Ινοσάρκωμα - GIII.



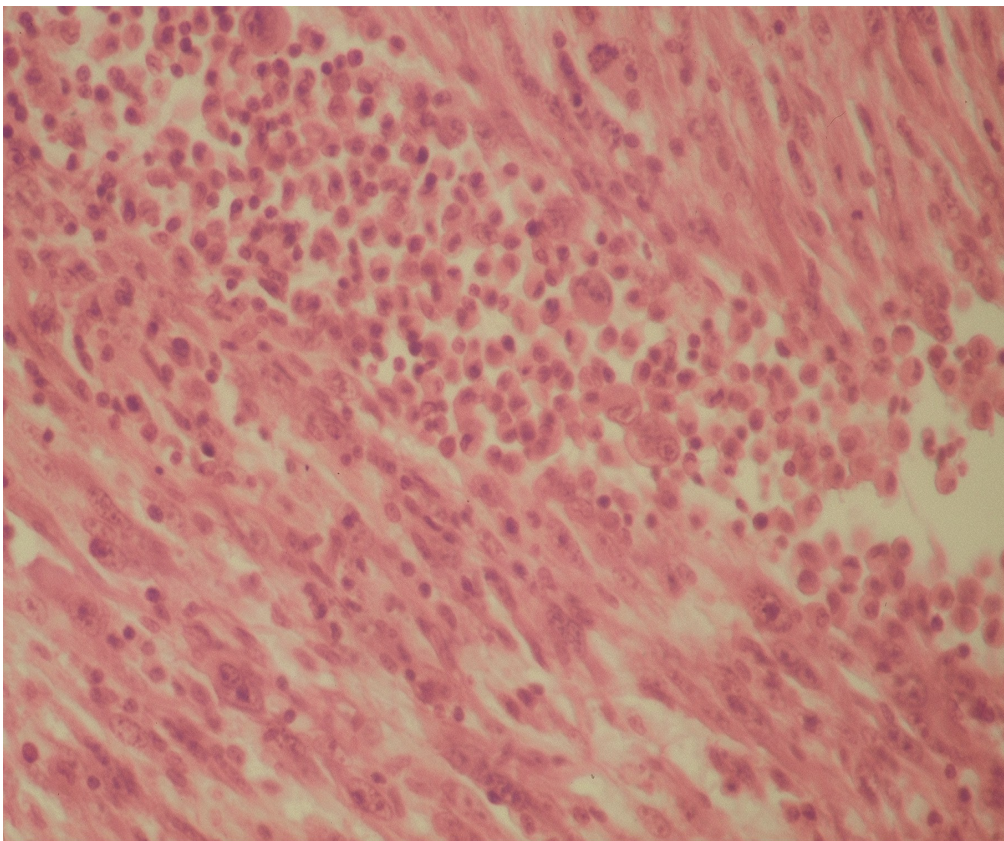
Φωτογραφία 45: Πνεύμονας – Μετάσταση.



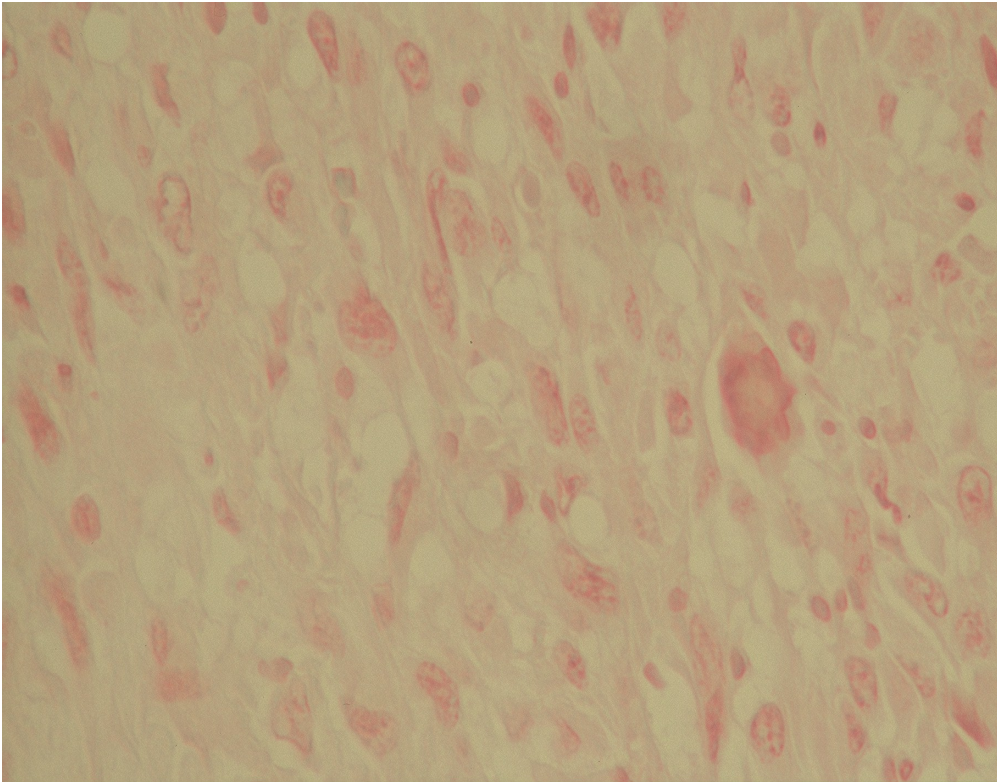
Φωτογραφία 46: Πνεύμονας – Πύκνωση.



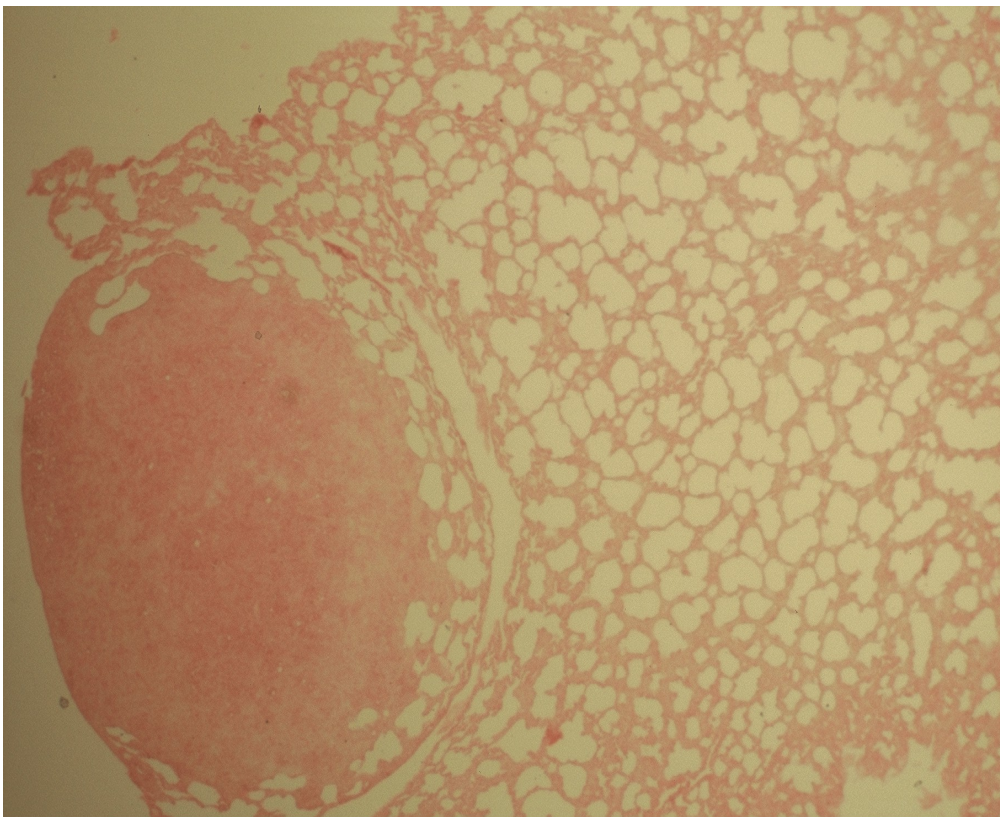
Φωτογραφία 47: Πολύμορφο Ιστοκύττωμα - GIII.



Φωτογραφία 48: Πολύμορφο Ιστοκύττωμα - GIII.



Φωτογραφία 49: Πολύμορφο Λιποσάρκωμα - GIII.



Φωτογραφία 50: Ραβδομυοσάρκωμα – Απόπτωση - GIII.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΦΥΤΩΝ

Viscum album + Abies alba



Φωτογραφίες 51 & 52: Φυτά *Viscum album* και *Abies alba* (ληφθέντα φυτά, από ημέρα συλλογής δειγμάτων).





Φωτογραφία 53: Λεπτομέρεια φυτού *Viscum album*, καλά αναπτυγμένο σε πλήρη καρποφορία (Φθινοπωρινή συλλογή δειγμάτων).



Φωτογραφία 54: Ημιπαράσιτο (*Viscum album*) και ξενιστής (*Abies alba*) σε κοινή συμβίωση.



Φωτογραφία 55: Άποψη ελάτου (*Abies alba*), με πολυάριθμα και καλά αναπτυγμένα φυτά Ιξού (*Viscum album*) επάνω του, από τη περιοχή της Ηπείρου (οροσειρά της Πίνδου).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Όλες οι φωτογραφίες (55), οι οποίες περιλαμβάνονται και στα 3 φωτογραφικά Παραρτήματα της παρούσας Διδακτορικής διατριβής, προέρχονται από το προσωπικό αρχείο του κ. Ζελοβίτη Ιωάννη.

