



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

&

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΛΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΔΡΑΣΕΩΝ ΛΙΠΙΔΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *VISCUM ALBUM* L.
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ ΜΠΟΥΛΑΚΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μπούλακα Αθηνάς: 4-9-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 655^α/10-3-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Καρκαμπούνας Σπυρίδων Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-3-2009

*«Ανάλυση απομόνωση και έλεγχος των βιολογικών δράσεων λιπιδιακών ουσιών του φυτού *Viscum album L* σε διάφορα μοντέλα καρκίνου»*

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 752^α/16-5-2013

Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσουκάτος Δημόκριτος	Καθηγητής Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πέσχος Δημήτριος	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κυτταρική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 10-7-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

«Η φύσις μηδέν μήτε ατελές ποιεῖ μήτε μάτην»

Αριστοτέλης (384-322 π.Χ)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα 2009-2013. Επιβλέπων της παρούσας διατριβής ήταν ο Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας κ. Σπυρίδων Καρκαμπούνας, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα διατριβή στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Με την επιμονή, την υπομονή, τις γνώσεις του και την εμπειρία του συνετέλεσε τα μέγιστα στο να εκπληρώσω τον πιο σημαντικό έως τώρα ακαδημαϊκό στόχο μιας μακράς και ιδιαίτερα επίπονης πορείας. Η αμέριστη εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου, αλλά και η πατρική και διάφανη καθοδήγησή του με βοήθησαν στο να επιτύχω σε αυτό το πολύ σημαντικό κομμάτι της ζωής μου.

Εν συνεχεία και με την ίδια θέρμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημόκριτο Τσουκάτο, Καθηγητή Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η συνεργασία που είχαμε αποτέλεσε σημείο σταθμό για την επίτευξη αυτού του μεγάλου στόχου. Το γεγονός ότι με δέχτηκε στο εργαστήριο του για την πραγματοποίηση όλων των χημικών διαδικασιών της παρούσας διατριβής, ο άψογος επαγγελματισμός του, η έμπειρη καθοδήγησή του και οι εύστοχες παρατηρήσεις του συνετέλεσαν σε μεγάλο βαθμό στο να φτάσω σήμερα στο σημείο που βρίσκομαι.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Άγγελο Ευαγγέλου, Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την κα. Βασιλική Καλφακάκου, Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ανεκτίμητη επιστημονική τους βοήθεια και τη συνεχή και υπομονετική καθοδήγηση τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Πέσχο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη συμβολή του στην διεκπεραίωση των παθολογοανατομικών αποτελεσμάτων, τα οποία αποτελούν σημαντικό κομμάτι στην ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής μου προσπάθειας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω θερμά την κα. Πατρόνα Βεζυράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων και τον κ. Δημήτριο Κιόρτση, Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οι οποίοι με την αμέριστη στήριξη τους, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους όλα αυτά τα χρόνια, με βοήθησαν στο να πραγματοποιήσω αυτό το σημαντικό και δύσκολο στόχο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημοσθένη Γκιώκα, Λέκτορα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας και τον κ. Ανδρέα Τζάκο, Λέκτορα Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπως επίσης και τους κ. Βασιλική Κοντογιάννη, κ. Παναγιώτη Σταθόπουλο και Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου για την πολύτιμη βοήθεια τους στην ταυτοποίηση της ουσίας που απομονώθηκε στην παρούσα διατριβή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Κωνσταντίνο Τέλλη, μέλος του εργαστηριακού προσωπικού του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του τμήματος Χημείας για την αμέριστη βοήθεια του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γεωπόνο Ιωάννη Ζελοβίτη, για την άψογη συνεργασία που είχαμε στην διεκπεραίωση των *in vivo* πειραμάτων, καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Λέκκα και τον Βιολόγο Παύλο Παπαθανασίου για την πολύτιμη συμβολή τους. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Παρασκευή Βραζέλη και τον Ιατρό Μιχαήλ Κολεντίνη για την βοήθεια τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Πατέρα Αγαπίωνα για τη βοήθεια του στη συλλογή του φυτού αλλά και για την στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την συνάδελφο, μα πάνω απ'όλα φίλη, Διδάκτορα Έλενα Γεωργίου, για την υποστήριξη, τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλο το γραμματειακό και εργαστηριακό προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για τη συνεχή συμπαράσταση και υποστήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Καρκίνος	7
1.2 Καρκινογένεση	8
1.3 Καρκίνος και χρόνια φλεγμονή	14
1.4 <i>Viscum album</i>	17
1.4.1 Ανασκόπηση του <i>Viscum album</i> στις λαϊκές παραδόσεις	17
1.4.2 Το <i>Viscum album</i> στην Ελλάδα	19
1.4.3 Ταξινομία του <i>Viscum album</i>	20
1.4.4 Μορφολογία του <i>Viscum album</i>	20
1.4.5 Διασπορά του <i>Viscum album</i>	23
1.4.6 Σχέση <i>Viscum album</i> – ξενιστή	23
1.4.7 Συστατικά του <i>Viscum album</i>	25
1.4.7.1 Λεκτίνες	25
1.4.7.2 Βισκοτοξίνες	27
1.4.8 Θεραπευτικές ιδιότητες του <i>Viscum album</i> στον καρκίνο	29
1.4.8.1 <i>In vitro</i> και <i>in vivo</i> μελέτες	29
1.4.8.2 Κλινικές μελέτες	31
1.4.9 Άλλες θεραπευτικές ιδιότητες του <i>Viscum album</i>	33
1.4.10 Μηχανισμοί δράσης του <i>Viscum album</i>	34
1.5 Τερπένια	36
1.5.1 Βιοσύνθεση των τερπενίων	37
1.5.2 Θεραπευτικές ιδιότητες των τερπενίων στον καρκίνο	41
1.6 Σκλαρεόλη	44
1.6.1 Βιολογικές ιδιότητες της σκλαρεόλης	45
1.7 Σκοπός της διατριβής	49
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
2.1 Υλικά και αντιδραστήρια	51
2.2 Εκχύλιση των λιπιδιακών συστατικών του φυτού <i>Viscum album</i>	53
2.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	54
2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των απομονωμένων λιπιδιακών συστατικών	56

2.5 Ποιοτικός προσδιορισμός μέσω Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)	57
2.6 Φασματοσκοπία Μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)	59
2.7 In vitro πειράματα	61
2.7.1 Κυτταροκαλλιέργεια	61
2.7.1.1 Διατήρηση των κυττάρων	61
2.7.1.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων.....	62
2.7.1.3 Σπορά των κυττάρων	63
2.7.2 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο του MTT.....	63
2.7.3 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο Trypan blue	64
2.7.4 Έλεγχος ικανότητας ανάπτυξης αποικιών	66
2.7.5 Έλεγχος μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αгарόζης.....	67
2.7.5.1 Απομόνωση DNA	68
2.7.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης.....	69
2.7.6 Έλεγχος μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω κυτταρομετρίας ροής.....	71
2.8 Ex vivo πειράματα.....	73
2.8.1 Έλεγχος της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	73
2.8.1.1 Απομόνωση αιμοπεταλίων.....	73
2.8.1.2 Έλεγχος συσσώρευσης	74
2.9 In vivo πειράματα	76
2.9.1 Οξεία τοξικότητα	76
2.9.2 Χρόνια τοξικότητα.....	76
2.9.3 Καρκινογένεση μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar-έλεγχος αντικαρκινικής δράσης	77
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	80
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
3.1 Αποτελέσματα εκχύλισης των λιπιδιακών συστατικών του φυτού	81
3.2 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης των κλασμάτων του φυτού με τη μέθοδο του MTT	82

3.3 Αποτελέσματα Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας.....	91
3.4 Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των απομονωθέντων λιπιδιακών συστατικών	94
3.5 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης των απομονωθέντων λιπιδιακών συστατικών με τη μέθοδο του MTT	95
3.6 Αποτελέσματα κυτταρικού θανάτου του λιπιδιακού συστατικού Vb μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	97
3.7 Αποτελέσματα Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb	98
3.8 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Μάζας (ESI-MS) του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb.....	100
3.9 Αποτελέσματα Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) της σκλαρεόλης	103
3.10 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Μάζας (ESI-MS) της σκλαρεόλης.....	105
3.11 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης σκλαρεόλης με τη μέθοδο του MTT ..	106
3.12 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης της σκλαρεόλης με τη μέθοδο του Trypan blue	111
3.13 Αποτελέσματα ικανότητας ανάπτυξης αποικιών.....	115
3.14 Αποτελέσματα μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	117
3.15 Αποτελέσματα μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω κυτταρομετρίας ροής.	119
3.16 Αποτελέσματα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	120
3.17 Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας	123
3.18 Αποτελέσματα χρόνιας τοξικότητας	126
3.19 Αποτελέσματα καρκινογένεσης μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων σε επίμνες Wistar- έλεγχος αντικαρκινικής δράσης της σκλαρεόλης.....	128
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	135
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	147
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	149
7. SUMMARY	153
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	159
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	173

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

Εκείνα τα κύτταρα των οποίων τα γονίδια που ρυθμίζουν τους μηχανισμούς αύξησης, διαφοροποίησης και επιβίωσης τους έχουν υποστεί γενετικές αλλαγές με αποτέλεσμα τον συνεχή πολλαπλασιασμό τους, ονομάζονται καρκινικά. Οι κυριότερες μεταλλαγές γονιδίων που υφίστανται είναι εκείνες των πρωτο-ογκογονιδίων (proto-oncogenes) (Lehman et al., 1991), τα οποία ενεργοποιούν την κυτταρική αύξηση, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor suppressor genes) (Sameer, 2013), τα οποία καταστέλλουν τη διαίρεση των κυττάρων, των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, τα οποία μετέχουν στην παράκαμψη του φυσιολογικού ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μαζί με τα γονίδια που κατευθύνουν την επιδιόρθωση του DNA (Vogelstein et al., 2004).

Η τοπική συσσώρευση ενός πλήθους τέτοιων ανώμαλων κυττάρων δημιουργούν μία κυτταρική μάζα, τον όγκο, ο οποίος μπορεί να είναι καλοήθης, είτε κακοήθης. Καλοήθεις ονομάζονται οι όγκοι των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, δεν είναι επεκτατικοί, δηλαδή δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς και δεν εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Γενικά, δεν προκαλούν σοβαρή βλάβη στο σώμα, εκτός εάν λόγω του μεγέθους τους ασκούν πίεση σε ζωτικά όργανα.

Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εκκρίνουν διαρκώς λυσοσωμιακά ένζυμα που διασπούν τις δομικές πρωτεΐνες που τα συγκρατούν αγκυροβολημένα στον ιστό προέλευσής τους με αποτέλεσμα να εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, να εισέρχονται στο εσωτερικό των αιματικών ή των λεμφικών αγγείων και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου αντίστοιχα είναι δυνατόν να μεταφέρονται σε άλλα σημεία του σώματος όπου σχηματίζουν δευτερογενείς αποικίες και ακολούθως όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση ή μεταστατική διασπορά (Clark, 1991).

1.2 Καρκινογένεση

Τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που απαντώνται σε όλες τις μορφές καρκίνου είναι (Blanpain, 2013):

- α) Αυτόνομη παραγωγή μηνυμάτων αύξησης
- β) Αντίσταση σε μηνύματα αναστολής του πολλαπλασιασμού
- γ) Αντίσταση στην απόπτωση
- δ) Αντίσταση στους μηχανισμούς γήρανσης
- ε) Αγγειογένεση
- στ) Δημιουργία μεταστάσεων

α) Αυτόνομη παραγωγή μηνυμάτων αύξησης

Η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των φυσιολογικών κυττάρων γίνεται μέσω των αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς και μετάγουν σήματα αύξησης σε μία πληθώρα ενδοκυττάριων μορίων, όπως οι πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής ύλης, καθώς και σε μόρια που ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση και τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.

Λόγω μεταλλαγών που υφίσταται ο μηχανισμός μεταγωγής σήματος, τα καρκινικά κύτταρα δεν δέχονται τα κατάλληλα σήματα πολλαπλασιασμού και έχουν την ικανότητα να συνθέτουν αυξητικούς παράγοντες με αυτοκρινή δράση, όπως η παραγωγή του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor, PDGF) και του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού α (transforming growth factor α , TGF α) (Witsch et al., 2010). Επίσης, οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς στους οποίους προσδένονται οι αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν ενεργότητα τυροσινικής κινάσης και υπερεκφράζονται, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF-R/*erbB* (Koji et al., 2012). Η υπερέκφραση των υποδοχέων, καθώς και οι δομικές αλλαγές που εμφανίζουν φαίνεται ότι επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να ανταποκρίνονται σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης διαφόρων αυξητικών παραγόντων.

Επίσης οι ιντεγκρίνες, διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων μεταξύ εξωκυττάριων μορίων και ακτίνης του κυτταροσκελετού, λειτουργούν ως μεταγωγείς σήματος, ενεργοποιώντας διάφορα ενδοκυτταρικά μονοπάτια ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως για

παράδειγμα το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των κινασών Ras, Raf, MAPK (Weis et al., 2011). Έχει βρεθεί ότι στο 30% των ανθρώπινων όγκων, το γονίδιο *ras* είναι μεταλλαγμένο και κωδικοποιεί τη σύνθεση δομικά διαφορετικών πρωτεϊνών Ras, οι οποίες προωθούν συνεχώς την απελευθέρωση μιτωτικών σημάτων, χωρίς την απαραίτητη συμμετοχή των ρυθμιστικών τους μορίων (Santarpia et al., 2012).

β) Αντίσταση σε μηνύματα αναστολής του πολλαπλασιασμού

Λόγω των μεταλλαγών που φέρουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, των οποίων ο ρόλος είναι η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνδυασμό με τις μεταλλαγές που φέρουν βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (Cdk), οι κυκλίνες (Jares et al., 2012), οι πρωτεΐνες p53 και Rb (Retinoblastoma gene protein, pRB) και οι αναστολείς των Cdk, όπως η p16 (Inhibitor Kinase 4A, INK4A) και η p14 (Inhibitor Kinase 4ARF, INK4ARF), απορυθμίζεται ο κυτταρικός κύκλος των καρκινικών κυττάρων και αποτέλεσμα αυτού είναι ο συνεχής πολλαπλασιασμός τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *myc*, η οποία επάγει τη μεταγραφή γονιδίων της μίτωσης τα οποία οδηγούν το κύτταρο στη φάση G1, με αποτέλεσμα τη συνεχή αποστολή μηνυμάτων εισόδου στον κυτταρικό κύκλο (Macleod, 2000).

γ) Αντίσταση στην απόπτωση

Ως απόπτωση καλείται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ένας αυστηρά ελεγχόμενος μηχανισμός κατά τον οποίο παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές, όπως συρρίκνωση του κυττάρου και αλλοιώσεις στην κυτταρική μεμβράνη, βιοχημικές μεταβολές, όπως η ενεργοποίηση των κασπασών, καθώς και μεταβολές στον πυρήνα του κυττάρου, όπως συμπύκνωση της χρωματίνης και θραύση του DNA (Tomek et al., 2012). Ο μηχανισμός της απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αποπτωτικών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων προάγουν την απόπτωση όπως οι πρωτεΐνες p53, Bax και Bak και των αντι-αποπτωτικών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων την αναστέλλουν όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2, Mcl-1, Bim, Bcl-6, Bmf και XIAP. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος ενεργοποιείται μέσω δύο διαφορετικών οδών, του υποδοχέα θανάτου και της μιτοχονδριακής οδού (Mariusz et al., 2013).

Η ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω των υποδοχέων θανάτου, είναι μία εξωγενής πορεία η οποία συντελείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και εξαρτάται από την ενεργοποίηση των κασπασών. Οι κασπάσες αποτελούν μία οικογένεια κυστεϊνικών εξωκυττάρων πρωτεασών, οι οποίες προάγουν τον κυτταρικό θάνατο καθώς επίσης την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή. Η εξωγενής πορεία κυτταρικού θανάτου ενεργοποιείται μέσω ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχέων οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF (tumor necrosis factor). Όταν ένας παράγοντας θανάτου, όπως ο παράγοντας Fas ή ο παράγοντας TNF-α προσδεθεί σε έναν υποδοχέα θανάτου, όπως ο υποδοχέας Fas (γνωστός και ως APO-1) ή ο υποδοχέας TNF-1, προκαλείται ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η ενεργοποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον ολιγομερισμό του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια και την έναρξη της μεταγωγής σημάτων για αποπτωτικό θάνατο. Επίσης ενεργοποιούνται διάφορες προσαρμοστικές πρωτεΐνες, όπως η FADD, οι οποίες περιέχουν περιοχές θανάτου και προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς θανάτου, όπως ο Fas. Η πρόσδεση της FADD στον υποδοχέα θανάτου Fas, καθώς και η πρόσδεση της προ-κασπάσης 8 στην ειδική περιοχή θανάτου DED (death effector domain) της FADD, οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8 μέσω ολιγομερισμού της και κατόπιν στην ενεργοποίηση και άλλων κασπασών όπως η κασπάση 3 (Elmore, 2007, Ouyang et al., 2012).

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού είναι μία ενδογενής πορεία η οποία συντελείται στο κυτταρόπλασμα και χαρακτηρίζεται από πολλαπλά γεγονότα. Έπειτα από επαγωγή κυτταρικού στρες, οι προ- και αντι- αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα την μεταβολή του διαμεμβρανικού μιτοχονδριακού δυναμικού και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C καθώς και άλλων προ-αποπτωτικών μορίων στο κυτοσόλιο. Η μεταφορά του κυτοχρώματος C στο κυτοσόλιο οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολυ-πρωτεϊνικού συμπλέγματος, του αποπτωσώματος, το οποίο αποτελείται από το κυτόχρωμα C, dATP, τον αποπτωτικό παράγοντα Araf-1 και την προ-κασπάση 9. Η δημιουργία του αποπτωσώματος οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών (Torres et al., 2013, Mahmunt et al., 2003).

Η ενεργοποίηση της κασπάσης 3, είτε μέσω του μονοπατιού του υποδοχέα νέκρωσης είτε μέσω του μιτοχondριακού μονοπατιού, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της στον πυρήνα του κυττάρου και την διαμεσολάβηση της στην έναρξη της σχάσης του πυρηνικού DNA καθώς και του επιδιορθωτικού ενζύμου του DNA PARP (poly-ADP-ribose polymerase) (Francis et al., 2012).

Η απενεργοποίηση ή η υπερέκφραση λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων που συμμετέχουν στον μηχανισμό της απόπτωσης, οδηγεί στην αναστολή του μηχανισμού της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και σαν αποτέλεσμα στον συνεχή πολλαπλασιασμό τους.

δ) Αντίσταση στους μηχανισμούς γήρανσης

Τα άκρα κάθε χρωμοσώματος αποτελούνται από τα τελομερή, χιλιάδες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες σταθεροποιούν το DNA. Κατά την αντιγραφή του DNA, η DNA πολυμεράση αδυνατεί να αντιγράψει τις αλληλουχίες αυτές και τον ρόλο αυτό τον αναλαμβάνει η τελομεράση. Παρόλα αυτά παρατηρείται μείωση του μήκους των τελομερικών άκρων κατά 50-200 νουκλεοτίδια σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Η διαδικασία αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό γήρανσης και λόγω ελλιπούς προστασίας του DNA μετά από ένα ορισμένο αριθμό αναδιπλασιασμών το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο (Cagatay et al., 2013). Τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να διατηρούν τα τελομερικά άκρα τους, λόγω της συνεχούς έκφρασης των γονιδίων της τελομεράσης. Το γεγονός αυτό τα καθιστά αθάνατα υπό την έννοια ότι η αναπαραγωγή τους δεν περιορίζεται σε έναν πεπερασμένο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων, όπως ισχύει σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά διαθέτουν πλέον την δυνατότητα ενός πολύ μεγάλου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων, αφού τα αποκοπτόμενα τμήματα των τελομερών, ανά κυτταροδιαίρεση, αποκαθίστανται διαρκώς (Raynaud et al., 2008). Η αθανатоποίηση των κυττάρων, λόγω της σταθεροποίησης του μεγέθους των τελομερών, δεν είναι ταυτόσημη με την καρκινική εξαλλαγή, διότι τα αθανатоποιημένα κύτταρα υπακούουν ακόμη στα σινιάλα αναστολής του πολλαπλασιασμού και αναπαράγονται με φυσιολογικούς ρυθμούς. Αν λόγω μεταλλαγών επισυμβεί απώλεια των ελέγχων αναστολής του πολλαπλασιασμού, τότε τα αθανатоποιημένα κύτταρα μεταπίπτουν σε νεοπλασματικά (Jiao Mu et al., 2002).

ε) Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται νέα αιμοφόρα αγγεία από προϋπάρχοντα αγγεία. Ο σχηματισμός των νέων αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς το αγγειακό ερέθισμα και τον πολλαπλασιασμό τους. Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και στην παροχή αίματος του όγκου (Ribatti et al., 2012). Η αγγειογενετική διαδικασία επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης διαφόρων αυξητικών παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Pradde et al., 2005, Plate et al., 2012), ο οποίος παράγεται από τον ίδιο τον όγκο και ενεργοποιεί την διαδικασία πολλαπλασιασμού των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και ο αυξητικός παράγοντας που δεσμεύεται στην ηπαρίνη (HARP), ο οποίος επάγει τον πολλαπλασιασμό, τον χημειοτακτισμό και την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης διάφορα είδη κυττάρων συμμετέχουν στην αγγειογένεση, όπως οι ινοβλάστες οι οποίοι παράγουν ινονεκτίνη και κολλαγόνο (Scanlon et al., 2013), τα μακροφάγα, τα οποία βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να εισβάλλουν στο γειτονικό στρώμα μέσω της καταστροφής της βασικής μεμβράνης (De Palma et al., 2013), τα περιθηλιακά κύτταρα, τα οποία μαζί με τα καρκινικά διεγείρουν τα ενδοθηλιακά μέσω της έκκρισης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Marino et al., 2013). Επίσης, παρουσία του VEGF, τα Τ λεμφοκύτταρα αναστέλλουν την παραγωγή της ιντερφερόνης γ (INF-γ) και των αντι-αγγειογενετικών κυτοκινών. Τέλος τα μαστοκύτταρα, τα οποία οδηγούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου μέσω του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (SCF) ο οποίος παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα, εκκρίνουν προ-αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 2 (FGF-2), η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) και ο αυξητικός παράγοντας όγκου β (TGF-β) (Gomes et al., 2013).

Είναι φανερό ότι η αδυναμία παραγωγής νέων αγγείων αποτελεί μια συνθήκη εξαιρετικά αρνητική για την ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου, καθόσον του στερεί την δυνατότητα να τροφοδοτηθεί με τα απαραίτητα υλικά για την ανάπτυξη των κυττάρων του.

στ) Δημιουργία μεταστάσεων

Τα καρκινικά κύτταρα, διηθούν τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, μετακινούνται στους μεσοκυττάριους χώρους και μέσω των αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων μεταναστεύουν σε άλλα σημεία του σώματος, όπου δημιουργούν μεταστάσεις (Scully et al.,).

Η έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων, κυρίως της οικογένειας των μεταλλοπρωτεϊνών (Matrix Metalloproteinases, MMPs), προάγουν την αποικοδόμηση των μορίων της εξωκυτταρικής ύλης (Broder et al., 2013). Κατά τη διέλευση τους στα αγγεία, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν διαφύγει τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, παραδείγματος χάριν μέσω των αιμοπεταλιακών σχηματισμών (επικάλυψη από αιμοπεταλιακούς θρόμβους), προσκολλώνται στο αγγειακό ενδοθήλιο σε απομακρυσμένες θέσεις, πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν δευτεροπαθείς εστίες όγκου (Labelle et al., 2012).

Οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό του κυττάρου, οι οποίες μπορεί να είναι κληρονομικές, είτε επίκτητες, οδηγούν στην καρκινογένεση. Βασικό ρόλο στη διαδικασία αυτή κατέχουν οι μεταλλάξεις των γονιδίων που μετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και έχουν την ικανότητα να διατηρούν τα επίπεδα των μεταλλαγών χαμηλά. Τέτοια γονίδια είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης των βάσεων, τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες επιδιορθώνουν είτε αφαιρούν τις βάσεις που έχουν τοποθετηθεί σε λάθος θέσεις και τα γονίδια επιδιόρθωσης των νουκλεοτιδίων, τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες αφαιρούν τα νουκλεοτίδια που έχουν τοποθετηθεί σε λάθος θέσεις. Όταν τα γονίδια αυτά απενεργοποιούνται, λαμβάνουν χώρα μεταλλαγές σε άλλα γονίδια με περισσότερο αυξημένους ρυθμούς (Aga Sammer, 2013).

Διάφοροι παράγοντες είναι υπαίτιοι για την εμφάνιση της καρκινογένεσης. Τέτοιου είδους παράγοντες είναι η ιοντίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία (Ramirez et al., 2005), οι καρκινογόνες χημικές ουσίες (Barrett, 1993), οι DNA και RNA ογκογόνοι ιοί (Chatburn et al., 2013, Kalland et al., 2009), η έκθεση σε οιστρογόνα (για τις γυναίκες) (Mertens-Walker et al., 2012) και η γενετική προδιάθεση (Schiffman et al., 2013).

1.3 Καρκίνος και χρόνια φλεγμονή

Είναι γνωστό από το 1863 ότι οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις συνδέονται άμεσα με την εξέλιξη του καρκίνου και ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις έχουν υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο στον πάσχοντα ιστό. Ιστοί που έχουν προσβληθεί από νεοπλασματικά κύτταρα φέρουν σημάδια της φλεγμονής. Στη φλεγμονώδη κατάσταση συμμετέχουν διάφοροι παράγοντες, όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα μεσεγχυματικά και τα επιθηλιακά κύτταρα, οι ενεργές ελεύθερες ρίζες, τα εικοσανοειδή και οι κυτοκίνες, τα οποία φέρουν ποικίλους λειτουργικούς ρόλους στη φλεγμονή και την εξέλιξη του καρκίνου (Chiba et al., 2012).

Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής και την προώθηση του καρκίνου. Τα κυτταρικά επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS) αυξάνονται κατά τη φλεγμονώδη κατάσταση, ως αποτέλεσμα την έκθεση των νουκλεϊκών οξέων στις ελεύθερες ρίζες και την τροποποίηση των βάσεων του DNA (Korde et al., 2012). Αυτού του είδους οι μεταλλάξεις προκαλούν την καταστροφή του DNA, τη δημιουργία αναντιστοιχιών των βάσεων του και τη συσσώρευση πληθώρας μεταλλάξεων, οι οποίες συνεχώς προωθούνται λόγω της αυξημένης λιπιδιακής υπεροξειδωσης και της χαμηλής αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενζύμων (Oltra et al., 2001).

Οι συσσωρευμένες μεταλλάξεις προκαλούν βλάβες στο DNA των περιφερικών επιθηλιακών κυττάρων και ενισχύουν τη μετάδοση σημάτων για την έκκριση κυτοκινών από τα λευκοκύτταρα και τα μακροφάγα, οι οποίες επάγουν τη διήθηση των ιστών προάγοντας τη μετάσταση και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του όγκου και της αγγειογένεσης (Rakoff-Nahoum, 2006). Οι κυριότερες κυτοκίνες είναι οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (IL1, IL6) (Woolery et al., 2011) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-α) (Greene et al., 2011, Braila et al., 2012). Η ιντερλευκίνη 1 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου δρουν άμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και επάγουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) (Kipanyula et al., 2013). Η ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού προωθεί την ενεργοποίηση ή την καταστολή της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων (Veenstra et al., 2012) και διεγείρει την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και η ιντερλευκίνη 6. Η ενεργοποίηση του

μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα kB ενισχύει επίσης την παραγωγή του ενζύμου κυκλοξυγενάση 2 (COX-2) η οποία αυξάνει την παραγωγή των ενεργών υπεροξειδωτικών ενδιάμεσων και ενισχύει την κυτταρική ανάπτυξη και την αγγειογένεση. Υπερεκφράζεται σε ασθενείς με καρκίνο και τα υψηλά της επίπεδα μειώνουν το προσδόκιμο επιβίωσης τους. Επίσης οι προσταγλανδίνες που προέρχονται από την κυκλοξυγενάση 2 συμμετέχουν στα πρώιμα στάδια της φλεγμονώδους απόκρισης. Η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) ίσως είναι η πιο σημαντική, διότι καταστέλλει την ανοσοαπόκριση, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των μακροφάγων, των T λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων. Διάφοροι αναστολείς της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) έχουν χρησιμοποιηθεί ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, αλλά προκαλούν ποικίλες παρενέργειες, εκτός από το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη), το οποίο θεωρείται ο πιο ασφαλής αναστολέας της (Wang et al., 2010, Dixon et al., 2013).

Επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στην εξέλιξη του καρκίνου, ο οποίος εκκρίνεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ενεργοποιείται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και την ιντερλευκίνη 10 (IL-10) (Baumgart et al., 2013). Ο παράγοντας STAT3 ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων και αναστέλλει την έκφραση των παραγόντων που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της αντικαρκινικής ανοσοποίησης, επηρεάζοντας αρνητικά την δραστηριότητα των CD8⁺ T κυττάρων, των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κύτταρα) και των μακροφάγων. Επιπλέον η ενεργοποίηση του STAT3 προκαλεί τη μειορύθμιση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας της τάξεως 2, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανοσολογικής ανοχής (Kanterman et al., 2006).

Οι κυτοκίνες ενεργοποιούν επίσης μιτογόνες πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες της καρκινογένεσης, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η αγγειογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση της εξωκυτταρικής οδού ρύθμισης της μεταγωγής σημάτων MAPK, στην οποία συμμετέχουν μιτογόνες πρωτεϊνικές κινάσες, της οποίας ο ρόλος στη μετάδοση σημάτων είναι σημαντικός (Meister et al., 2013).

Σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της διήθησης, της μετανάστευσης και της επιβίωσης των νεοπλασματικών κυττάρων παίζουν οι χημειοκίνες. Οι χημειοκίνες

παράγονται και εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα και από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Έχουν την ικανότητα να οδηγούν τα νεοπλασματικά κύτταρα που φέρουν συγγενείς υποδοχείς χημειοκινών σε συγκεκριμένους προορισμούς, με αποτέλεσμα τη διήθηση των ιστών και τη μεταστατική εξάπλωση. Ένας από τους κυριότερους υποδοχείς χημειοκινών που υπερεκφράζεται σε διάφορες νεοπλασίες αποτελεί ο CXCR4 (Kanterman et al., 2012, Veenstra et al., 2012).

Οι διάφοροι συνδυασμοί χημειοκινών και υποδοχέων χημειοκινών προκαλούν την συσσώρευση κατασταλτικών κυττάρων, τα οποία προωθούν την ανάπτυξη του όγκου και συμβάλλουν στην αλλοίωση της ανοσιακής απόκρισης. Τα κύτταρα αυτά αναστέλλουν την ωρίμαση των δενδριτικών κυττάρων, μειώνουν την ικανότητα των T κυττάρων να συσσωρεύονται στους λεμφαδένες, μειώνουν τις λειτουργικές ικανότητες των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων) και των T λεμφοκυττάρων και μεταβάλλουν τον φαινότυπο των μακροφάγων από τον τύπο M1 στον τύπο M2, ο οποίος προάγει την αγγειογένεση του όγκου, την διήθηση και τη μετάσταση (Serafini et al., 2006, Gabrilovich et al., 2013).

Όπως φαίνεται, ποικίλοι παράγοντες συμβάλλουν στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, τα κύτταρα του οποίου βοηθούν τα νεοπλασματικά κύτταρα να αποφύγουν τους μηχανισμούς ανοσίας και δημιουργούν ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την εξέλιξη και τη μετάσταση ενός κακοήγη όγκου.

Τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτων μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα παγκοσμίως. Οι θεραπευτικές επιλογές που υπάρχουν είναι ποικίλες, όπως η χημειοθεραπεία, η ραδιοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία και η μεγάλη ποικιλία των ειδικών χειρουργικών επεμβάσεων, οι οποίες ενδείκνυνται και επιλέγονται με βάση το είδος της νεοπλασματικής νόσου, το στάδιο και τη θέση της στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις οι θεραπείες αυτές δεν επαρκούν για την πλήρη εξάλειψη της νόσου και ταυτόχρονα προκαλούν ποικίλες παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Πολλοί ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στην εύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων τα οποία θα μπορούν να αναστείλουν τους μηχανισμούς ανάπτυξης των όγκων, να ενισχύσουν την θεραπευτική ικανότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων και να μειώσουν τις παρενέργειες που προκαλούν.

Μια προσέγγιση πολύ ενδιαφέρουσα είναι η προσπάθεια μετατροπής της νεοπλασματικής νόσου από ταχέως εξελισσόμενη και επιθετική σε πολύ βραδείας εξέλιξης, έτσι ώστε οι μεταβολές στον χρόνο να είναι ουσιαστικά ελέγξιμες και αναστρέψιμες. Επίσης μια παράλληλη προσέγγιση είναι η προσπάθεια δημιουργίας φαρμάκων ικανών να ενεργοποιούν τα κλασσικά χημειοφάρμακα όταν αυτά πλέον έχουν δημιουργήσει ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα οι φυσιολογικοί ιστοί του οργανισμού να εξακολουθούν να ανθίστανται στα χημειοθεραπευτικά. Ο προσεκτικός και εκλεκτικός έλεγχος της μετάστασης των νεοπλασματικών κυττάρων επίσης ένας πολύ μεγάλος στόχος.

1.4 *Viscum album*

Το *Viscum album* (ιξός, γκι) είναι ένα επίφυτο, ημιπαρασιτικό φυτό που αναπτύσσεται επί διαφόρων δέντρων-ξενιστών. Χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα ως θεραπευτικό φυτό, ενώ το 1917 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην θεραπεία του καρκίνου από τους ανθρωποσοφιστές Rudolf Steiner και Ita Wegman. Έκτοτε πάνω από 100.000 ασθενείς έχουν θεραπευτεί από το *Viscum album*. Εδώ και 30 χρόνια, είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ανοσοενισχυτικό έκδοχο στη θεραπεία του καρκίνου σε περιοχές της Ευρώπης και κυρίως στην Γερμανία και την Σουηδία (Kaegi, 1998, Mansky et al., 2003, Maier et al., 2002, Seifert et al., 2008, Gardin, 2009, Legnani, 2008).

1.4.1 Ανασκόπηση του *Viscum album* στις λαϊκές παραδόσεις

Ο σπάνιος ιξός (γκι) που βρίσκεται στις βελανιδιές, ήταν ιερό φυτό που ενέπνεε μεγάλο σεβασμό για τους αρχαίους Κέλτες και Γερμανούς και χρησιμοποιούνταν ως φορέας μεταφυσικών δυνάμεων στις θρησκευτικές τελετουργίες των δρυίδων, οι οποίοι ήσαν οι ιεροφάντες των αρχαίων Ευρωπαϊκών θρησκειών κυρίως στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη. Από τους αρχαίους καιρούς ο ιξός (γκι) ήταν ένα από τα πιο μυστηριώδη και ιερά φυτά στην ευρωπαϊκή λαϊκή παράδοση, περιβεβλημένο με ιδιότητες υπερφυσικές, χαρισμένες από τους θεούς. Θεωρούνταν σύμβολο ζωής και γονιμότητας, αντίδοτο ενάντια στα δηλητήρια αλλά και αφροδισιακό.

Κατά το Μεσαίωνα και αργότερα, κλαδιά από γκι κρέμονταν από το ταβάνι για να εκδιώξουν τα κακά πνεύματα. Στην Ευρώπη τα έβαζαν μπροστά στις πόρτες των σπιτιών και των στάβλων για να προλαβαίνουν την είσοδο των μαγισσών. Πίστευαν επίσης ότι το γκι από βελανιδιά μπορούσε να σβήσει μια φωτιά. Αυτή η αντίληψη προερχόταν από την αρχαία πίστη ότι το γκι μπορούσε από μόνο του να φυτρώσει στο δέντρο κατά τη διάρκεια μιας αστραπής. Στις Ρωμαϊκές παραδόσεις, ο ιξός θεωρείται πως εξασφαλίζει την καλοτυχία. Οι ιατρικές και οι υποτιθέμενες μαγικές ιδιότητες του φυτού χρησιμοποιούνται ακόμα και ιδιαίτερα στις αγροτικές περιοχές. Το έθιμο αυτό υπάρχει από τους Δάκες. Ο ιξός όπως πίστευαν, είχε τη δύναμη της γονιμότητας, και η "κοπριά" από την οποία πίστευαν ότι ξεπηδούσε πίστευαν ότι είχε τη δύναμη να δίνει ζωή.

Στις μέρες μας, ο ιξός (γκι) συνήθως χρησιμοποιείται σαν Χριστουγεννιάτικη διακόσμηση, συνήθεια η οποία προέρχεται από ένα έθιμο των Ρωμαίων, οι οποίοι συνήθιζαν να στέλνουν κλαδιά δέντρων μαζί με άλλα δώρα στους φίλους τους, κατά τη διάρκεια των χειμερινών εορτών του θεού Κρόνου, γνωστών ως Σατουρνάλια (Saturnalia). Επίσης πιστεύεται ότι το γκι φύτευσε για πρώτη φορά στις πατημασιές του Χριστού, όταν αυτός βάδιζε στη γη και τα αγκαθωτά φύλλα του αλλά και οι κόκκινοι καρποί του, συμβολίζουν τα μαρτύρια του Σωτήρα, λόγος για τον οποίο το γκι λέγεται και το «αγκάθι του Χριστού» σε πολλές γλώσσες της Βόρειας Ευρώπης. Πιθανόν η σχέση με αυτούς τους μύθους ήταν ο λόγος που το γκι ονομάστηκε το «Άγιο Δέντρο», όπως αναφέρεται γενικότερα από τους παλιότερους συγγραφείς.

Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (23-79 μ.Χ.) αναφέρει ότι αν το γκι φυτευτεί κοντά σε ένα σπίτι ή αγρόκτημα, διώχνει μακριά το δηλητήριο, το προστατεύει από τους κεραυνούς και τη μαγεία και ότι τα λουλούδια του κάνουν το νερό να παγώνει. Από την αρχαιότητα θεωρούνταν θεραπευτικό φυτό. Για να θεραπεύσουν τις αρρώστιες, οι Κέλτες χρησιμοποιούσαν τα αυτοφυή φυτά των αγρών, του βουνού και τα δέντρα. Τα πιο σημαντικά ήταν ο ιξός και η βελανιδιά (Faulkes, 1995, Graham, 2002, Drury, 1987).

1.4.2 Το *Viscum album* στην Ελλάδα

Οι μεγαλύτεροι φιλόσοφοι στην ιστορία της Ελλάδας, ο Αριστοτέλης και ο Θεόφραστος, Πατέρες της Ζωολογίας και της Βοτανολογίας αντίστοιχα, ασχολήθηκαν με τον ιξό. Ο Θεόφραστος ταυτοποίησε το φυτό σε ελληνικές περιοχές και αναρωτήθηκε γιατί το φυτό αυτό αναπτύσσεται πάνω σε συγκεκριμένα δέντρα-ξενιστές. Τα ερωτήματα του αυτά αναφέρονται και στο βιβλίο του «Περί φυτών αιτιών». Ο Αριστοτέλης καθώς παρατηρούσε τα τρία είδη πτηνών ρακοσυλλεκτών και εκκαθαριστών (πτηνά thrush) σε τυχαία σημεία, συνέδεσε τη δραστηριότητα της κατανάλωσης των καρπών του ιξού από τα εν λόγω πτηνά με τη διάδοση του φυτού. Ήταν προφανές ότι οι σπόροι του ιξού μεταφερόταν σε κάποια απόσταση από την έδρα του φυτού μέσω των ρακοσυλλεκτικών πτηνών κι εν συνεχεία αποβαλλόταν με τα κόπρανα άπεπτοι, αλλά περιβεβλημένοι με μια κολλώδη ουσία που θα μπορούσε να τους προσδέσει σε κάποιο κλαδί. Εάν στο σημείο αυτό υπάρχει κάποιο δέντρο-ξενιστής, τότε επιτυγχάνεται η διασπορά του φυτού (Arianoutsou et al., 1994).

Στην Ελλάδα ο ιξός αποτελούσε σημαντικό συμπλήρωμα νωπής τροφής για τα ζώα ιδίως τους χειμερινούς μήνες που η τροφή ήταν σπάνια. Η χορήγηση του ιξού ως τροφή των αιγοπροβάτων αυξάνει μάλιστα τη παραγωγή γάλατος εκ μέρους τους χωρίς κόστος, ενώ ακόμα και σήμερα στις πλαγιές του Ταϋγέτου, αλλά και στα όρη της Ηπείρου, οι τσοπάνηδες συλλέγουν το πολύτιμο φυτό που παρέχει η φύση για να ενισχύσουν την ποιότητα και την ποσότητα της διατροφής των ποιμνίων τους τον χειμώνα. Ενδεχομένως όταν ο ιξός καταναλίσκεται από τα αιγοπρόβατα λειτουργεί και ως φαρμακευτικό φυτό που ενισχύει τα ανοσοποιητικά τους συστήματα και αυξάνει τις αντοχές τους απέναντι σε μικροβιακές επιδημίες, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν μελέτες που να αποδεικνύουν έναν τέτοιο ρόλο.

Επίσης, ο φλοιός του χρησιμοποιείται για το πλέξιμο σχοινίων και χοντρού σπάγκου. Στην Αίγυπτο από τον Ιξό κατασκευάζουν σε ανάμιξη με άλλες κόλλες, την λεγόμενη ιξοκόλλα. Επίσης είναι πασίγνωστο γιατί από τον καρπό του κατασκευάζουν τις ιξόβεργες ή ξοβέργες, πασαλειμμένες με την κολλώδη ουσία των καρπών του για τη σύλληψη μικρών πουλιών.

Άλλες ελληνικές ονομασίες του ιξού είναι οι εξής: Κορδία, βίσκον το λευκό, μελάς, μηλιός, ξοβέργα, ιερό ξύλο, το ξύλο του σταυρού

1.4.3 Ταξινόμια του *Viscum album*

Το γένος *Viscum* ανήκει στην οικογένεια των Βισκοειδών. Στο παρελθόν κατατασσόταν στην οικογένεια των Λορανθίδων. Τα Βισκοειδή (όπως και τα Λορανθοειδή) ανήκουν στα Σανταλοειδή (Vidal-Russell, 2008). Περίπου 1500 είδη φυτών παγκοσμίως ανήκουν στην κατηγορία των γκι, αλλά μόνο το γκι με τον λευκό καρπό βρίσκεται στην Ευρώπη. Τα περισσότερα είδη του γένους *Viscum* βρίσκονται στην Αφρική και την Μαδαγασκάρη. Επίσης έχει βρεθεί σε περιοχές της νότιας και κεντρικής Ασίας, της Ιαπωνίας και της δυτικής Αυστραλίας. Μεγαλώνει πάνω στις διακλαδώσεις των δέντρων (όπως βελανιδιά, πεύκο, μηλιά, λεμονιά κ.α.), σε θαμνώδη και άλλα φυτά (Gil Bar-Sela, 2011, Zuber, 2004).

Τρία υποείδη, τα οποία διαφέρουν στην επιλογή του ξενιστή και ένα τέταρτο υποείδος, γνωστό στην Κρήτη, έχουν αναγνωριστεί στην Ευρώπη:

Το *V. album album* L. που παρασιτεί στα δικοτυλήδονα δέντρα.

Το *V. album abietis* που παρασιτεί στα είδη *Abies*.

Το *V. album austriacum* που παρασιτεί στα είδη *Pinus* και σπανιότερα στα είδη *Larix* και *Picea*.

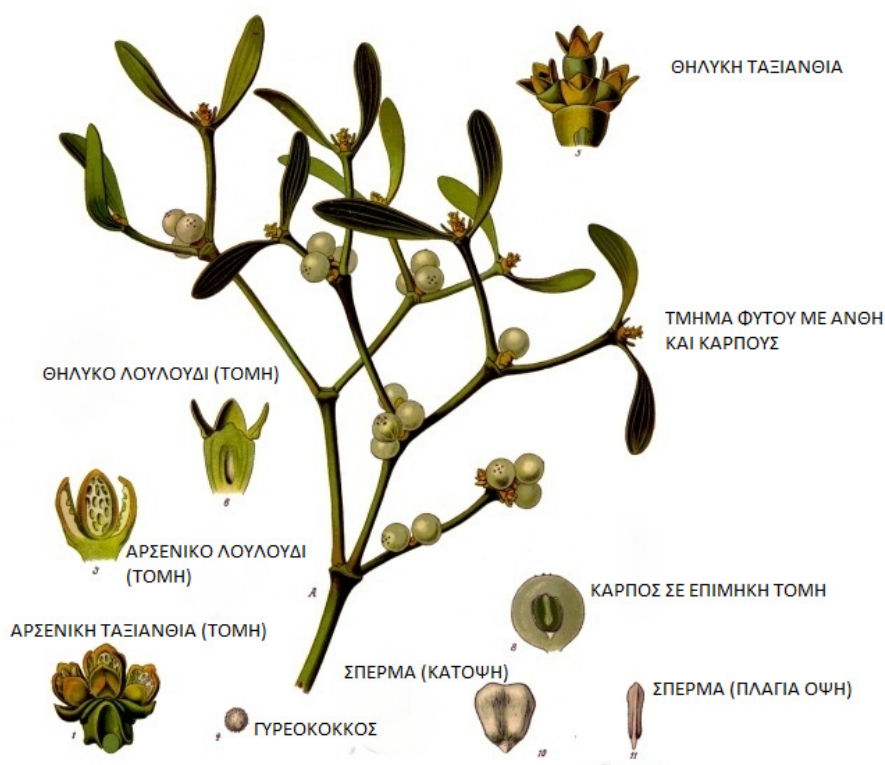
Το *V. album creticum* που παρασιτεί στο είδος *Pinus halepensis brutia* αποκλειστικά στην Κρήτη (Zuber, 2009).

1.4.4 Μορφολογία του *Viscum album*

Το *Viscum album* είναι ένας σφαιρικός πολυετής, αειθαλής θάμνος, ο οποίος ανθίζει στο τέλος του χειμώνα (Μάρτιο-Απρίλιο). Η συνολική διάμετρος του μπορεί να φτάσει τα 150 εκατοστά και τα κλαδιά του είναι πράσινα, κυλινδρικά, με δικρανοειδείς διακλαδώσεις και με διάμετρο πάνω από 10 χιλιοστά. Επειδή κάθε χρόνο κάνει μια διχοτομική διακλάδωση, μπορούμε να ορίσουμε την ηλικία του φυτού. Τα φύλλα του είναι αντίθετα, σπάνια ελικοειδή, χωρίς μίσχο, στενόμακρα, αμβλεία (στομωμένα), σαρκώδη - δερματώδη και κιτρινοπράσινα. Το μήκος των φύλλων κυμαίνεται από 1,3 έως 10,7 εκατοστά και το πλάτος από 0,3 έως 4,3 εκατοστά και έχουν 3-5 ορατά, σχεδόν παράλληλα νεύρα και μία διάχυτη δικτυωτή νεύρωση (Εικόνα 1). Το σχήμα και το μέγεθος των φύλλων ποικίλουν σημαντικά, όχι μόνο μεταξύ του ενός ατόμου, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών ατόμων του ίδιου δέντρου-ξενιστή ή των διαφορετικών δέντρων-ξενιστών. Οι διαφορές αυτές

20

οφείλονται στο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται το *Viscum album* και τα θρεπτικά συστατικά που προσλαμβάνει από τον ξενιστή. Τα στόματα είναι κατανεμημένα και στις δύο πλευρές των φύλλων και η πυκνότητά τους μπορεί να ποικίλει (Zuber, 2004, Vicas, 2010).



Εικόνα 1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Viscum album*.

Το *Viscum album* είναι δίοικο φυτό. Τα άνθη του είναι δυσδιάκριτα, χωρίς μίσχο, μικρά και κιτρινοπράσινα, συνήθως 3-5 σε τριάδες με ένα ακραίο και δύο πλαϊνά άνθη. Τα άνθη και των δύο φύλων παράγουν νέκταρ, με τα θηλυκά να παράγουν περισσότερο από τα αρσενικά. Τα αρσενικά άνθη είναι μεγαλύτερα από τα θηλυκά, έχουν τέσσερα σέπαλα διαμέτρου 4-5 χιλιοστών τοποθετημένα σε δύο σπείρες (έλικες). Τα θηλυκά άνθη έχουν τέσσερα σέπαλα επίσης και διάμετρο 0,5-1 χιλιοστά. (Snogerup et al., Cullen J).

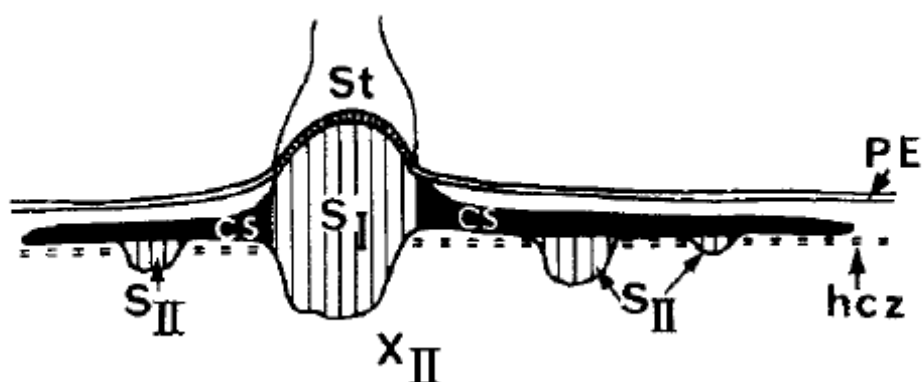
Ο καρπός του *Viscum* συχνά αποκαλείται ως ψευδοκαρπός, διότι αποτελείται από γλοιώδη και κολλώδη ιστό. Τρεις τέτοιοι καρποί τυπικά σχηματίζονται σε μία διχάλα της κορυφής του βλαστιδίου του προηγούμενου έτους και μερικές φορές στα προγενέστερα διακλαδισμένα σημεία (Εικόνα 1). Οι καρποί έχουν διάμετρο 6-10 χιλιοστά και είναι σφαιρικοί. Το επικάρπιο είναι λευκό ή περιστασιακά κίτρινο. Το

λεπτό μεσοκάρπιο αποτελείται από βισκίνη, μία κολλώδη φυτική ουσία. Υπάρχουν δύο κολλώδη στρώματα, ένα εξωτερικό, προφανώς εύπεπτο, κελουλοσικό λεπτό στρώμα και ένα εσωτερικό άπεπτο στρώμα πεκτίνης. Το πολύ λεπτό ενδοκάρπιο προσκολλάται στον σπόρο (Zuber, 2004).

Το ενδοφυτικό σύστημα του *Viscum album* αποτελείται από δύο μορφολογικά, ανατομικά και φυσιολογικά διαφορετικά μέρη (Εικόνα 2):

1. Τα φλοιώδη νημάτια, τα οποία είναι χλωροφυλλικά, κυλινδρικά και επιμηκυμένα όργανα που διασχίζουν το φλοιώδες παρέγχυμα και το φλοιώδη ιστό του ξενιστή και έχουν ξύλωμα και φλοίοωμα.
2. Το μυζητήρα, ο οποίος λειτουργεί σαν γέφυρα για τη μεταφορά νερού και θρεπτικών συστατικών από τον ξενιστή. Ο μυζητήρας αναπτύσσεται ραγδαία μέσα στο κάμβιο του ξενιστή και σφηνώνεται στον ξυλώδη ιστό του χωρίς να διαπερνά το ξύλωμα.

Οντογενετικά δύο είδη μυζητήρων μπορούν να διακριθούν, ο πρωτογενής μυζητήρας και ο δευτερογενής. Ο σχηματισμός των δευτερογενών μυζητήρων είναι ένα κυκλικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα από τον Μάρτη – Απρίλη μέχρι τον Αύγουστο. Ο δευτερεύον αυτός μυζητήρας προέρχεται από τα εξωτερικά στρώματα των κυττάρων των φλοιωδών νηματίων και αναπτύσσεται όπως ο πρωτογενής μέσα στο κάμβιο του ξενιστή (Salle, 1978, Thoday, 1951, Smith, 1983).



Εικόνα 2. Ενδοφυτικό σύστημα του *Viscum album*. SI, πρωτογενής μυζητήρας, SII, δευτερογενής μυζητήρας, St, βλαστός του *Viscum album*, CS, φλοιώδη νημάτια, XII, ξυλώδης ιστός ξενιστή, PE, περίδερμα ξενιστή, hcz, περιφερική ζώνη καμβίου ξενιστή.

1.4.5 Διασπορά του *Viscum album*

Τα άνθη του *Viscum album* επικονιάζονται από τα έντομα και οι καρποί του διασπείρονται από τα πουλιά, το κυριότερο από τα οποία είναι το *mistle thrush*, ένα είδος τσίχλας (Zuber et al., 2000). Τα πουλιά έλκονται από τον ώριμο καρπό του *Viscum album*, ο οποίος έχει έντονο λευκό ή κίτρινο χρώμα και τον καταπίνουν είτε ολόκληρο, αποβάλλοντας το εξωκάρπιο και λαμβάνοντας την βισκίνη και τον σπόρο σαν τροφή, είτε λαμβάνουν μόνο την βισκίνη η οποία περιβάλλει τον σπόρο. Έπειτα αποβάλλουν το σπόρο, στον οποίο εξακολουθεί να υπάρχει μία μικρή ποσότητα βισκίνης και σαν συνέπεια έχει τη δυνατότητα να προσκολληθεί πάνω στον κατάλληλο ξενιστή. Πολλές φορές ο σπόρος προσκολλάται στα φτερά ή τα πόδια των πουλιών, αλλά καταλήγει εν τέλει στα κλαδιά του κατάλληλου ξενιστή (Kuijt, 1969, Reid, 1991).

Παρατηρείται ότι η ένταση της μόλυνσης από το *Viscum* διαφέρει μεταξύ των ξενιστών, αλλά και τα είδη των ξενιστών που παρασιτεί είναι ποικίλα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα πουλιά διασπείρουν τους καρπούς του γκι με μεγαλύτερη συχνότητα σε κάποιους ξενιστές (πιθανών σε εκείνους όπου ήδη παρασιτεί το φυτό) και η ποσότητα των σπόρων που καταλήγουν σε αυτούς διαφέρει ανάμεσα τους. Επίσης, η εδραίωση του καρπού γίνεται με πιο επιτυχή τρόπο σε ορισμένα είδη ξενιστών. Φαίνεται ότι η προτίμηση των πουλιών στους σπόρους επηρεάζει σημαντικά την διασπορά του φυτού (Rongsong, 2011, Aukema, 2002).

1.4.6 Σχέση *Viscum album* – ξενιστή

Το *Viscum album* είναι φωτοσυνθετικά ενεργό αλλά παρόλα αυτά για τις λειτουργικές του ανάγκες λαμβάνει θρεπτικά συστατικά και νερό από το δέντρο-ξενιστή στο οποίο παρασιτεί μέσω του μυζητήρα του. Η υδροστατική πίεση των κυττάρων των δύο τμημάτων του μυζητήρα που ενώνουν τον ξενιστή και το γκι, ευνοεί το δεύτερο (Zweifel et al., 2012, Garkoti et al., 2002).

Τα φύλλα του *Viscum album* περιέχουν χλωροφύλλη α και β καθώς και καροτένια. Παρόλο που η χλωροφύλλη β είναι δευτερεύον σημασίας στην φωτοσύνθεση και δρα έμμεσα μεταφέροντας το φως που απορροφά στην α., παίζει πρωταρχικό ρόλο τους καλοκαιρινούς μήνες, όπου βρίσκεται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με την α. Αυτό οφείλεται στην σκίαση που προκαλείται το

καλοκαίρι από τα φύλλα του ξενιστή και της δύσκολής πρόσβασης των φύλλων του *Viscum* στο φως (Vicas et al., 2010). Επιπλέον, εκτός από την εποχή, ο λόγος της χλωροφύλλης α/β διαφέρει ανάλογα το είδος του ξενιστή και το τμήμα του φυτού (βλαστός-φύλλο) (Vicas et al, 2009).

Παρόλο που το *Viscum album* έχει την ικανότητα να φωτοσυνθέτει, ο άνθρακας της βιομάζας του δεν προέρχεται μόνο από το CO₂ που παράγεται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης αλλά ένα μέρος του προέρχεται από τον ξενιστή. Η μεταφορά του άνθρακα από το ξύλωμα του ξενιστή στο ξύλωμα του γκι δεν είναι ελεγχόμενη και η ποσότητα που μεταφέρεται εξαρτάται από τη συγκέντρωση των υδατανθρακών που έχει ο ξενιστής. Η συγκέντρωση αυτή διαφέρει ανάλογα με την εποχή και το είδος του ξενιστή (Escher et al., 2004). Επίσης η μεταφορά αζώτου και ιχνοστοιχείων εξαρτάται από αυτούς τους παράγοντες καθώς και από το περιβάλλον, το οποίο επηρεάζει σημαντικά τα συστήματα ξενιστών-παρασίτων (Cengiz et al., 2010).

Παρόλα αυτά, μερικές φορές η ποσότητα του θείου που μεταφέρεται από τον ξενιστή στο *Viscum album* δεν είναι αρκετή για την ανάπτυξη του φυτού. Μετά το άζωτο, το θείο θεωρείται ως το πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό για πολλά φυτά. Η επιλεκτική αποδόμηση μιας ομάδας θειονινών, των βισκοτοξινών, φαίνεται πως παρέχει στο παράσιτο το θείο και το άζωτο που χρειάζεται κατά το σχηματισμό των νέων του φύλλων (Schrader-Fischer et al., 1993).

Έχει βρεθεί ότι η αφθονία του γκι, η διασπορά του και η ένταση της μόλυνσης σχετίζονται με τις οικολογικές παραμέτρους του ξενιστή όπως η διάμετρος του χώρου που καταλαμβάνει συνολικά, η απόσταση του από το κοντινότερο επίφυτο αλλά όχι από το ύψος τους. Οι ατομικές διαφορές των δέντρων-ξενιστών παίζουν σημαντικό ρόλο στην αφθονία και στην κατανομή των γκι (Kartoolinejad et al., 2007).

Η παρασιτική σχέση *Viscum*-ξενιστή πολλές φορές είναι καταστρεπτική για τον ξενιστή. Έχει αποδειχθεί ότι η παρασιτική προσβολή των δέντρων από το γκι προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του ξενιστή, μείωση του μήκους και του αριθμού των φύλλων του καθώς και πτώση των φύλλων του. Αυτή η απώλεια των φωτοσυνθετικών ιστών οδηγεί στην μείωση του φωτοσυνθετικού ρυθμού, τη μείωση της ικανότητας αφομοίωσης άνθρακα, τη μείωση της παραγωγής υδρογονανθράκων και μείωση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών και του νερού που χρειάζονται οι μολυσμένοι ιστοί του ξενιστή για την ανάπτυξή τους (Zweifel et al., 2012, Rigling et al., 2010).

1.4.7 Συστατικά του *Viscum album*

Το *Viscum Album* περιέχει λεκτίνες και βισκοτοξίνες, που όπως αποδείχτηκε έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα, αλλά περιέχει και άλλα ποικίλα χημικά συστατικά, χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία επίσης έχουν κυτταροτοξικές ιδιότητες (Zarkovic et al., 2001).

Η ανάλυση του φυτού έδειξε την ύπαρξη διάφορων τερπενοειδών, μονοτερπενοειδών, τριτερπενοειδών και αλειφατικών ενώσεων (κυρίως αλκανίων και αλκοολών). Επίσης, το φυτό αυτό περιέχει διάφορα φλαβονοειδή, λιπαρά οξέα, ταννίνες, σαπωνίνες, θειόλες, φυτοστερόλες, κυκλιτόλες, γλυκοζίτες, πεπτίδια, ένζυμα, αμίνες, ανόργανες ουσίες, βιταμίνη E και προβιταμίνη D2. Παρόλο που πολλά από τα συστατικά του φυτού *Viscum album* είναι πλέον γνωστά, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως οι ουσίες εκείνες οι οποίες προσδίδουν ποικιλία θεραπευτικών ιδιοτήτων στο φυτό αυτό (Cebovic et al., 2008, Elluru et al., 2008, Khil et al., 2007, Büssing A, editor, 2000).

1.4.7.1 Λεκτίνες

Υπάρχουν δύο τύποι λεκτινών στο *Viscum album*. Οι τύπου II ριβοσωμικές απενεργοποιητικές πρωτεΐνες (RIPsII), οι οποίες ανακαλύφθηκαν στο Ευρωπαϊκό γκι και έχουν μοριακό βάρος 63kDa και οι προσδεδεμένες στη χιτίνη λεκτίνες (chitin-binding lectins, cbML) οι οποίες έχουν μοριακό βάρος μόλις 11kDa. Οι ερευνητές έχουν δώσει μεγάλη σημασία στις πρωτεΐνες του πρώτου τύπου (MLs), λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να προκαλούν απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα ενώ οι cbML λόγω της χαμηλής αντιγονικότητας και τοξικότητας τους δεν έχουν καλά μελετηθεί (Huber et al., 2010). Οι πρωτεΐνες του πρώτου τύπου αποκαλούνται επίσης αγλουτινίνες (*Viscum album* agglutinin, VAA), λόγω της ικανότητάς τους να συγκολλούν τα ερυθροκύτταρα και διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, των οποίων το μοριακό βάρος, η ειδικότητα στους υδρογονάνθρακες που πιθανώς να οφείλεται στις δομικές διαφορές της B αλυσίδας τους, η βιολογική δράση αλλά και τα γονίδια από τα οποία κωδικοποιούνται διαφέρουν (Pevzner et al., 2004, Kourmanova et al., 2004). Οι ML-I (VAA-I) οι οποίες έχουν ειδικότητα στους γαλακτοζίτες, οι ML-II (VAA-II) οι οποίες έχουν ειδικότητα στους γαλακτοζίτες αλλά και στην N-ακετύλ-γαλακτοζαμίνη και οι ML-III (VAA-III)

οι οποίες έχουν στενή εξειδίκευση στην Ν-ακετύλ-γαλακτοζαμίνη (Hajtó et al., 2005, Wacker et al., 2005, Jung et al., 1990).

Είναι δηλαδή σαφές ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες προσδένονται όχι σε οποιοδήποτε μόριο αλλά σε μόρια τα οποία έχουν τους χαρακτήρες που προαναφέρθηκαν (γαλακτοζικοί υδατάνθρακες, και γαλακτοζαμινικά μόρια). Συνεπώς αν τεθούν σε ένα εναιώρημα κυττάρων είτε νεοπλασματικού είτε φυσιολογικού τύπου, οι λεκτίνες θα προσδεθούν σε αυτού του είδους τα σάκχαρα που υπάρχουν στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη.

Οι λεκτίνες είναι ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από μία Α-αλυσίδα η οποία περιέχει τρεις συντηρημένους ατομικούς τομείς και από μία Β-αλυσίδα η οποία περιέχει δύο τομείς με παρόμοια στερεοχημική δομή. Η ενζυμική Α-αλυσίδα αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση ενδοκυτταρικά διασπώντας τον γλυκοσιλικό δεσμό N-C ενός συγκεκριμένου αδενικού κατάλοιπου στο 28s ριβοσωμικό RNA της 60s υπομονάδας του ευκαρυωτικού ριβοσώματος ενώ η Β-αλυσίδα προσδένεται ειδικά στα σάκχαρα/υδρογονάνθρακες και αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες αλυσίδες σακχάρων ή υποδοχείς που περιέχουν σάκχαρα στην κυτταρική επιφάνεια. Φαίνεται ότι και οι δύο αλυσίδες συμβάλλουν στην κυτταροτοξικότητα των λεκτινών και η εκλεκτικότητα της Β-αλυσίδας ίσως να έχει σημαντικό ρόλο στην εξειδικευμένη δράση τους ενάντια στα καρκινικά κύτταρα (Fu et al., 2011, Wenhui et al., 2006, Mikeska et al., 2005, Olsnes et al., 1982).

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η δράση των εκχυλισμάτων πλούσιων σε λεκτίνες διαφέρει. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στον τρόπο και στο σημείο που προσδένεται η Β-αλυσίδα (Seifert et al., 2008). Οι λεκτίνες συμμετέχουν στον μηχανισμό άμυνας του φυτού. Έχει βρεθεί ότι η φυτική αυξητική ορμόνη αμίδιο του 3-(p-υδροξυφαίνυλο)-προπιονικού οξέος (φλορακεταμίδιο, PA) η οποία βρίσκεται στο ξύλωμα των ξενιστών προσδένεται ανάμεσα στις δύο αλυσίδες της ML-I του παρασίτου και συγκεκριμένα στον τρίτο τομέα της Α-αλυσίδας και στους δύο τομείς της Β. Η πρόσδεση αυτή μπορεί ενδεχομένως να παίζει σημαντικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό του παρασίτου ενάντια στον ξενιστή και αποτρέπει την φυτική ορμόνη του ξενιστή να παρεμβάλλεται στο ρυθμιστικό σύστημα του παρασίτου/γκι (Meyer et al., 2007). Επίσης η φυτοορμόνη ζεατίνη προσδένεται στην ML-I και αυτό αποκαλύπτει την ικανότητα του παρασίτου να προστατεύει τον εαυτό του από τον μηχανισμό διαπνοής του ξενιστή (Meyer et al., 2008).

Πολλές έρευνες δείχνουν ότι οι λεκτίνες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό νεοπλασματικών κυττάρων ποικίλων σειρών *in vitro* και καταστέλλουν τους καρκινικούς όγκους *in vivo* (Pryme et al., 2006, Stirpe et al., 1982). Επίσης μελέτες δείχνουν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση μη τοξικών δόσεων της ML1 προκαλεί ανοσοενισχυτικές επιδράσεις όπως ο πολλαπλασιασμός των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων) και των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων, την ενίσχυση της φαγοκυτταρικής ικανότητας των κοκκιοκυττάρων και των μονοκυττάρων, αύξηση του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF και την απελευθέρωση κυτοκινών (Wacker et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές ασχολούνται με μία ανασυνδυασμένη λεκτίνη, την αβισκουμίνη (*aviscumine*) η οποία παράχθηκε με κλωνοποίηση από το βακτήριο *Escherichia coli* και η οποία βρίσκεται τώρα σε μια μεγάλη κλίμακα παραγωγής. Η λεκτίνη αυτή έχει παρόμοια δομή και κυτταροτοξική δράση με τις φυτικές λεκτίνες. Σε μοριακό επίπεδο, είναι περίπου 5000 φορές δυναμικότερη από τον συνήθη θεραπευτικό παράγοντα ανδριαμυκίνη εναντίων διάφορων ανθρώπινων καρκινικών σειρών και 1500 φορές από την πακλιταξόλη. Επίσης, η επώαση ενός φαρμάκου με την αβισκουμίνη, μειώνει την ποσότητα του φαρμάκου που χρειάζεται για την ίδια κυτταροτοξική επίδραση. Η θεραπεία με την λεκτίνη αυτή αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων καθώς και τις μεταστάσεις, όπως αποδείχθηκε σε *in vivo* πειράματα με επίμυες και αυξάνει το χρόνο ζωής τους. Επιπλέον πολλοί ανοσολογικοί παράγοντες επηρεάζονται από αυτήν *in vitro*, όπως οι ιντερλευκίνες 2 (IL-2), 1α (IL-1α), 6 (IL-6), η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF-α), τα T λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK κύτταρα) (Heinz et al., 2011).

1.4.7.2 Βισκοτοξίνες

Οι βισκοτοξίνες είναι κατιονικές πρωτεΐνες που ανήκουν στις θειονίνες τύπου III, αποτελούμενες από 45-47 αμινοξέα. Έχουν αμφιπαθή χαρακτήρα λόγω της ύπαρξης μίας υδρόφοβης και μίας υδρόφιλης περιοχής. Έχουν απομονωθεί από τα φύλλα και τους βλαστούς του Ευρωπαϊκού γκι (*Viscum album*) και έχουν ποικίλα κυτταροτοξικά χαρακτηριστικά σε διάφορες νεοπλασματικές σειρές. Αυτή η ποικιλία των δράσεων που εμφανίζουν ίσως να οφείλεται στην τρισδιάστατη δομή τους. Η

αλληλουχία των αμινοξέων, η θέση των δισουλφιδικών δεσμών και η κατανομή τους στο φυτό έχουν αποκαλύψει έξι ισομερή, τα A1, A2, A3, B, 1-PS και U-PS. Έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν σύμπλοκα με το αρνητικά φορτισμένο DNA και θεωρείται ότι το μοτίβο τους έλικα-στροφή-έλικα ίσως να αντιπροσωπεύει ένα τομέα πρόσδεσης του DNA. Ο τρόπος δράσης τους δεν είναι σαφής διότι η βιολογική συμπεριφορά τους διαφέρει. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην διαφορετική θέση των αμινοξέων τους και στο φορτίο τους. Λόγω του θετικού τους φορτίου, θεωρείται ότι αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και σαν αποτέλεσμα να τις καταστρέφουν (Giudici et al., 2003, Romagnoli et al., 2003). Επίσης, οι θετικά φορτισμένες βισκοτοξίνες δημιουργούν σύμπλοκα με το αρνητικά φορτισμένο DNA και σαν αποτέλεσμα προστατεύουν την διπλή έλικα από τη θερμική μετουσίωση, αφήνοντας τη χωροδιάταξη του DNA ανεπηρέαστη (Büssing et al., 1999). Η βισκοτοξίνη A3 θεωρείται η πιο τοξική ενώ η B είναι η λιγότερο ισχυρή και δεν έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ύπαρξη ενός μοναδικού καταλοίπου αργινίνης που προεξέχει από το υδροφοβικό επίπεδο που σχηματίζουν δύο αμφιπαθείς α έλικες μέσω των οποίων οι βισκοτοξίνες αλληλεπιδρούν με τις πλασματικές μεμβράνες (Coulon et al., 2003).

Η βιολογική τους δράση σχετίζεται με την άμυνα του φυτού καθώς η μεγάλη έκφρασή τους δίνει στο φυτό την δυνατότητα να ενισχύει την ανοχή του στα παθογόνα.

Έχει βρεθεί ότι οι βισκοτοξίνες αυξάνουν την φαγοκυτταρική ικανότητα των φυτικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων) ενάντια στα νεοπλασματικά κύτταρα σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (Tabiasco et al., 2002), έχουν μία αυξημένη ανοσοενισχυτική επίδραση στα ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα και επάγουν την απόπτωση στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Giudici et al., 2003). Σύμφωνα με άλλες έρευνες οι βισκοτοξίνες αποσταθεροποιούν τη κυτταρική μεμβράνη των λεμφοκυττάρων *in vitro*, μέσω της διόγκωσης των μιτοχονδρίων τους, προκαλούν την απώλεια των ακρολοφίων τους και δημιουργούν δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου μέσα σε διάστημα 2-4 ωρών, διαδικασίες οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του νεκρωτικού θανάτου. Τα εναπομείναντα ζώντα κύτταρα, των οποίων ο αριθμός είναι μεγαλύτερος, λαμβάνουν ένα ξεχωριστό σήμα θανάτου, επάγουν την έκφραση των μιτοχονδριακών μεμβρανικών μορίων Apo 2.7 σε διάστημα 24 ωρών και ακολουθούν την διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου (Büssing and Wagner et al., 1999, Büssing and Vervecken et al., 1999).

1.4.8 Θεραπευτικές ιδιότητες του *Viscum album* στον καρκίνο

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού *Viscum album* εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες: από το υποείδος του φυτού, από το είδος του δέντρου-ξενιστή (Doehmer et al., 2011), από την περιοχή από την οποία συλλέγεται, από την εποχή συγκομιδής του (Onay-Ucar et al., 2006), από το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του εκχυλίσματος (φύλλα, καρποί, κλαδιά), από τη φύση και το στάδιο της ασθένειας και κυρίως από τον κάθε ασθενή. Θεωρείται ότι η φαρμακολογική δραστηριότητα των συστατικών του πιθανών να μεταβιβάζεται από το δέντρο-ξενιστή στο παρασιτικό φυτό και για αυτό το λόγο οι βιολογικές δράσεις του *Viscum* να διαφέρουν (Vidal-Russell et al., 2008, Bar-Sela, 2011, Heinzerling et al., 2006).

1.4.8.1 *In vitro* και *in vivo* μελέτες

Η ποικιλία των βιολογικών και των ανοσολογικών δράσεων του *Viscum album* είναι εντυπωσιακή. Θεωρείται ότι οι λεκτίνες οφείλονται για την κυτταροτοξική δράση του φυτού. Μελέτες έχουν δείξει πως εκχυλίσματα πλούσια σε λεκτίνες έχουν ισχυρότερη δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με εκείνα των οποίων η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη (Maier et al., 2002, Büssing et al., 1996). Παρόλα αυτά, για την δημιουργία του εκχυλίσματος χρησιμοποιείται το φυτό εξ ολοκλήρου κυρίως, λόγω της συνεργειακής δράσης των συστατικών του μεταξύ τους, αλλά και με τα συμβατά αντινεοπλασματικά φάρμακα (Seifert et al., 2008).

Τα υδατικά εκχυλίσματα του φυτού είναι ευρέως διαδεδομένα στην Ευρώπη. Οι βιολογικές τους δράσεις διαφέρουν ανάλογα το είδος του δέντρου ξενιστή από το οποίο προέρχονται αλλά και από το είδος των νεοπλασματικών κυττάρων. Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων ποικίλων νεοπλασματικών σειρών, καθυστερώντας την διαδικασία του κυτταρικού κύκλου σε διαφορετικές φάσεις, ανάλογα το είδος της νεοπλασματικής σειράς, προκαλώντας είτε αποπτωτικό είτε νεκρωτικό θάνατο (Kovacs, 2010). Επιπλέον εμποδίζουν την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τον σχηματισμό αγγείων και να οδηγούν τον όγκο σε ασιτία. Σε μελέτη που έγινε με διάφορες κυτταρικές σειρές βρέθηκε ότι το Iscador® Quercus (εκχύλισμα του φυτού από δέντρο-ξενιστή βελανιδιά), πλούσιο σε λεκτίνες, επάγει την απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, ενώ το Iscador® Malus (εκχύλισμα του φυτού από δέντρο-ξενιστή

μηλιά), επίσης πλούσιο σε λεκτίνες επάγει την απόπτωση μέσω του υποδοχέα νέκρωσης. Επίσης η κυτταροτοξική δράση του Iscador® Pinus (εκχύλισμα του φυτού από δέντρο-ξενιστή πεύκο), πλούσιο σε βισκοτοξίνες και με χαμηλή περιεκτικότητα σε λεκτίνες, οδηγεί σε νεκρωτικό θάνατο (Ramaekers et al., 2007).

Επίσης, τα μεθανολικά εκχυλίσματα του φυτού αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών ηπατικών κυττάρων HepG-2 κυττάρων *in vitro*, με ένα δοσο-εξαρτώμενο και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Pieme et al., 2010).

Τα εκχυλίσματα του φυτού έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση και να μειώνουν τις παρενέργειες των αντικαρκινικών φαρμάκων. Έχει αποδειχθεί ότι το εκχύλισμα του φυτού μειώνει τις παρενέργειες που προκαλούνται από το αντικαρκινικό φάρμακο μεθοτρεξάτη, το οποίο είναι τοξικό για τα φυσιολογικά κύτταρα και προκαλεί μείωση των μιτωτικών δεικτών και αύξηση των χρωμοσωμικών εκτροπών (CAs) σε κύτταρα του μυελού των οστών ποντικών. Αντιθέτως η χορήγηση *Viscum album* και κουερσετίνης πριν από τη χορήγηση της μεθοτρεξάτης στα ποντίκια, αυξάνει τον αριθμό των μιτωτικών δεικτών και μειώνει τις χρωμοσωμικές εκτροπές (Sekeroglu et al., 2012). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι το υδατικό εκχύλισμα έχει δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στα λευχαιμικά Jurkat κύτταρα και ότι ο συνδυασμός εκχυλίσματος με το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη ενισχύει την κυτταροτοξική δράση και των δύο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ στις μικρότερες υπάρχει ανταγωνισμός. Επιπλέον, ο συνδυασμός λεκτινών και των αντικαρκινικών φαρμάκων δοξορουβικίνης, σισπλατίνης (cisplatin) ή ταξόλης ενισχύει την κυτταροτοξική δράση τους ενάντια στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του πνεύμονα A549. Άλλες μελέτες δείχνουν την ίδια δράση για τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες βινκριστίνη (vincristine), μαφοσφαμίδη (mafosfamide), ιδαρουβικίνη (idarubicin) και σισπλατίνης (cisplatin) ενάντια στις ανθρώπινες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές K562 και KG1a (Saboná et al., 2009). Τα φρέσκα εκχυλίσματα του φυτού Abnoba®Mali-2 και Abnoba®Fraxini-2 (προερχόμενα από δέντρα-ξενιστές μηλιά και φλαμουριά αντίστοιχα) έχουν δοσοεξαρτώμενη αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα ενάντια στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MFM 223 και KPL-1 και η δράση τους είναι συγκρίσιμη με αυτήν των χημειοθεραπευτικών παραγόντων σισπλατίνης, πακλιταξόλης και δοξορουβικίνης *in vitro* (Sidler et al., 2005). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι ολόκληρο το εκχύλισμα του φυτού και όχι τα μεμονωμένα συστατικά του

(λεκτίνες και βισκοτοξίνες) προστατεύει τα ενεργοποιημένα περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος (PBMc) από τις μεταλλαγές που προκαλούνται κατά τη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα κυκλοφωσφαμίδη (CP) *in vitro*. Το εκχύλισμα του φυτού ενισχύει τη σταθερότητα του DNA και προστατεύει την έκφραση του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) και τη μεταφορά των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων, η οποία μειώνεται έπειτα από την προσθήκη του CP (Büssing et al., 1995). Τα εκχυλίσματα του φυτού επάγουν την απόπτωση τόσο των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (HUVEC) όσο και των αθανатоποιημένων ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων (IVEC) και επειδή τα κύτταρα αυτά σχετίζονται στενά με την αγγειογένεση, ίσως αυτό να εξηγεί την καταστολή του όγκου που προκύπτει από την χορήγηση των εκχυλισμάτων του φυτού σε *in vivo* μοντέλα κακοήθους νεοπλασματος, αλλά και στους καρκινοπαθείς ανθρώπους (Van Huyen Duong et al., 2002). Επίσης, το εκχύλισμα του *Viscum album* αυξάνει την κυτταροτοξική ικανότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων) του ανοσοποιητικού συστήματος *in vitro* και *in vivo* (Hajto et al., 2009) καθώς επίσης αυξάνει και τον αριθμό τους.

1.4.8.2 Κλινικές μελέτες

Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται ως ανοσοενισχυτικό έκδοχο στην θεραπεία του καρκίνου, παράλληλα με την χημειοθεραπεία, την ραδιοθεραπεία και την ορμονοθεραπεία (Kienle et al., 2010). Διάφορα σκευάσματα του φυτού υπάρχουν στην αγορά όπως το Helixor, το abnovaVISCUM, το Isorel ενώ το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το Iscador. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι στη Γερμανία το 2002 συνταγογραφήθηκαν 465.000 συνταγές του *Viscum album* σε ασθενείς με καρκίνο εξωτερικών ογκολογικών κλινικών ενώ η δεύτερη συχνότερη συνταγογραφούμενη ουσία ήταν το ταμοξιφέν (329.000 συνταγές) (Horneber et al., 2010). Διάφορες έρευνες δείχνουν την αύξηση του χρόνου επιβίωσης καρκινοπαθών έπειτα από τη χρήση σκευασμάτων του φυτού *Viscum Album*, την μείωση των πιθανοτήτων μετάστασης των όγκων (Mansky et al., 2003, Gardin, 2009, Cazacu et al., 2003), την μείωση του μεγέθους του όγκου (Legnani, 2008) ενώ έχει επίσης αναφερθεί η πλήρη εξάλειψη των μεταστατικών όγκων καθώς και του αρχικού μετά από τη μακροχρόνια χορήγηση των παρασκευασμάτων του φυτού (Kirsch, 2007). Η χορήγηση

των σκευασμάτων του φυτού πλούσιο σε λεκτίνες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι υποβάλλονταν παράλληλα σε χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία και ορμονοθεραπεία μείωσε τη ναυτία, τα συμπτώματα του γαστρεντερικού σωλήνα, την κούραση και την κατάθλιψη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου η οποία δεν λάμβανε το εκχυλίσμα του φυτού (Sood et al., 2007). Επίσης το σκεύασμα του φυτού αύξησε το προσδόκιμο επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού καθώς και την ψυχοσωματική τους αυτορρύθμιση, δηλαδή την αίσθηση ευεξίας και επάρκειας, την εσωτερική ισορροπία και την αίσθηση της ικανότητας ελέγχου στρεσογόνων καταστάσεων (Ziegler et al., 2010).

Η χορήγηση των σκευασμάτων του φυτού σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο γκεμισιταβίνη (gemcitabine), μείωσε τις παρενέργειες του φαρμάκου και αύξησε το προσδόκιμο επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (Matthes et al., 2010). Μείωση του βαθμού επικινδυνότητας παρατηρήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έπειτα από χορήγηση του (Ostermann et al., 2009). Επίσης έχει παρατηρηθεί αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο της μήτρας, των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας που λάμβαναν σκευάσματα του φυτού, καθώς επίσης παρατηρήθηκε ύφεση του όγκου σε ασθενείς με καρκίνου του υπεζωκότα, του μαστού και των ωοθηκών και καλύτερη ποιότητα ζωής (Kienle et al., 2009). Επίσης η χορήγηση ενός εκχυλίσματος πλούσιο σε λεκτίνες σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σταδίου 2 έδωσε θετικά αποτελέσματα (Mabed et al., 2004).

Φαίνεται ότι τα διάφορα σκευάσματα του φυτού που χρησιμοποιούνται επηρεάζουν θετικά τις περισσότερες φορές τους ασθενείς με καρκίνο, είτε όσον αφορά την πρόοδο την ασθένειάς τους, είτε την ποιότητα της ζωής τους. Αυτή η επιρροή σχετίζεται με το είδος του καρκίνου αλλά και με τον κάθε ασθενή, διότι σε περιπτώσεις διαφόρων τύπων λευχαιμίας και μελανώματος δεν παρατηρείται καμία βελτίωση (Styczynski et al., 2006, Kleeberg et al., 2004).

Ο τρόπος δράσης του εκχυλίσματος είναι πολυπαραγοντικός και εξαρτάται από το είδος του δέντρου-ξενιστή, από τη δοσολογία που χορηγείται, από τον τρόπο χορήγησης (ενδοϋπεζωκοτική ενστάλλαξη, υποδόρια, ενδοφλέβια, περιεγχειρητικά), από το είδος της νεοπλασίας καθώς και από τον ίδιο τον ασθενή (Braedel-Ruoff, 2010). Επίσης αυξάνει την φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων και έχει

παρατηρηθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα των CD4+CD25+ και των CD8+CD25+ Τ λεμφοκυττάρων, την έκφραση των CD69 ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων και των CD3-CD16+CD56+ φυσικών φονικών κυττάρων (Fidan et al., 2008).

Οι παρενέργειες που έχουν αναφερθεί από ασθενείς μετά από τη χορήγηση του εκχυλίσματος είναι ερυθρίαση και σκλήρυνση στο ενέσιμο σημείο, πονοκέφαλος, αδυναμία, πυρετός, μυϊκός πόνος, αϋπνία και προβλήματα συγκέντρωσης. Επίσης ορισμένοι ασθενείς εμφάνισαν αλλεργικές αντιδράσεις στο εκχύλισμα του φυτού. Παρόλα αυτά οι ασθενείς δεν διέκοψαν τη θεραπεία με το εκχύλισμα και παρατηρήθηκε ότι βελτιώθηκε η ποιότητα της ζωής τους καθώς ένιωθαν μεγαλύτερη ζωντάνια και αυτονομία (Brandenberger et al., 2011, Kienle et al., 2011).

1.4.9 Άλλες θεραπευτικές ιδιότητες του *Viscum album*

Επιπλέον, στο ευρύ φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων του *Viscum album* συγκαταλέγονται οι αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές του ιδιότητες (Ömer et al., 2003), οι αντιϊκές (Karagoz et al., 2003), καταπραϋντικές, αντιυπερτασικές, αντιυπογλυκαιμικές και διουρητικές του δράσεις. Επίσης, χρησιμοποιείται στη θεραπεία του διαβήτη, για την μείωση της χοληστερίνης, των χρόνιων κραμπών (μυϊκοί σπασμοί), των εγκεφαλικών συμφορήσεων, σε ασθενείς με στομαχικά, καρδιακά προβλήματα και δυσκολίες στην αναπνοή, σε ασθενείς με ηπατίτιδα C καθώς και ως ανοσοδιεγερτικό στην θεραπεία του AIDS (Vidal-Russell et al., 2008, Elluru et al., 2008, Eggenschwiler et al., 2007, Avcý et al., 2006, Didem et al., 2005, Tusenius et al., 2001). Το φυτό επηρεάζει το καρδιαγγειακό σύστημα δρώντας άμεσα στις χολινεργικές οδούς (πνευμονογαστρικό νεύρο) και μειώνει την πίεση του αίματος. Άλλες ιδιότητες του *Viscum album* είναι οι νευροφυσιολογικές δράσεις του επί των σπλάχνων, καθώς όπως αποδείχθηκε μεταβάλλει τις κινητικές αντιδράσεις των εντέρων που έχουν απομονωθεί από επίμυες (Radenkovic et al., 2006) ενώ σε μελέτη που έγινε επί απομονωμένων και διαποτιζόμενων παρασκευασμάτων καρδιάς ινδόχοιρου στην μηχανή ανάρτησης καρδιάς Langendorff βρέθηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα του φυτού έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες (Tenorio et al., 2005). Επίσης πρόσφατες μελέτες έδειξαν τις αντι-ψυχωτικές, αντι-επιληπτικές και κατασταλτικές ιδιότητες του εν λόγω φυτού στα πειραματόζωα (Gupta et al., 2012). Επιπλέον το *Viscum album* δρα συνεργιστικά με τα αντι-υπερτασικά, τους χολινεργικούς παράγοντες, τα

κατασταλτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος, τα διουρητικά, τους αντι-διαβητικούς και αντινεοπλασματικούς παράγοντες καθώς επίσης αναστέλλει την δράση των ανοσοκατασταλτικών παραγόντων (Posadzki et al., 2012).

1.4.10 Μηχανισμοί δράσης του *Viscum album*

Όπως αναφέρθηκε, οι βιολογικές και οι ανοσολογικές δράσεις του *Viscum album* είναι ποικίλες. Τα συστατικά του επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων, την διαδικασία μεταγωγής σημάτων, τη *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση και τις ενζυμικές δραστηριότητες. Έχουν την ικανότητα να προσδένονται και να προσφύονται επιλεκτικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και να επάγουν την διαδικασία της απόπτωσης ή τη νέκρωση ποικίλων νεοπλασματικών σειρών. Επιπλέον αυξάνουν τη δραστηριότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (NK κυττάρων), των T και B λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και ενεργοποιούν την φαγοκυττάρωση (Yesilada et al., 1998, Elluru et al., 2008, Eggenschwiler et al., 2007, Sagar et al., 2005). Επίσης, σύμφωνα με μελέτες τα ενεργά συστατικά του *Viscum album* μειώνουν τις βλαβερές και μεταλλαξιγόνες επιδράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου που δημιουργούνται κατά τη χημειοθεραπεία και τη ραδιοθεραπεία, περισυλλέγοντας τις ελεύθερες ρίζες και ασκώντας προστατευτικό ρόλο έναντι της παραγωγής υδρο-υπεροξειδίων και της εν γένει λιπιδικής υπεροξειδωσης. Επίσης, τα φλαβονοειδή που εμπεριέχονται στο φυτό, λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων μειώνουν το οξειδωτικό στρες (Janakat et al., 2008, Seifert et al., 2008).

Οι μηχανισμοί ακριβούς δράσης των συστατικών αυτών στην θεραπεία των νεοπλασματικών νόσων δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Θεωρείται ότι επάγουν τη διαδικασία της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της εξαρτώμενης από το μιτοχόνδριο οδού, ενώ άλλες μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν ότι η επαγωγή της απόπτωσης μπορεί να προκληθεί και μέσω της οδού του υποδοχέα θανάτου (Khil et al., 2007).

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι μέσω των ενεργών συστατικών του *Viscum* αναστέλλεται η αγγειογένεση μέσω της αναστολής του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (Elluru et al., 2008, Sagar et al., 2005). Επίσης, ενεργοποιείται η διαδικασία της μεταγραφής και επάγεται η έκκριση διάφορων

κυτοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες 1a, 1b, 2, 6, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α, η ιντερφερόνη γ, και η ενεργοποίηση διαφόρων κασπασών. Επιπλέον, η έκκριση των κυτοκινών επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DC) μέσω της αύξησης των συνδιεγερτών και των αντιγονικών μορίων που είναι παρόντα. Τα δενδριτικά κύτταρα είναι πολύ σημαντικά στην ανοσοαπόκριση, καθώς διεγείρουν τα T-κύτταρα και πολλές κυτοκίνες. Η επαγωγή αυτών των ουσιών είναι μεγίστης σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών έμφυτων ανοσοαποκρίσεων ενάντια στα νεοπλασματικά κύτταρα (Van Huyen Duong, 2006, Kovacs, 2004, Elluru et al., 2008, Seifert et al., 2008).

Επιπλέον, τα συστατικά του φυτού μειώνουν την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης Bcl-2. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να περιορίζει τα γερασμένα και κατεστραμμένα κύτταρα και ρυθμίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Λόγω της ύπαρξης των καρκινικών κυττάρων η παραγωγή της είναι αυξημένη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C. Επίσης τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής σχετίζονται με την ανοχή στα αντικαρκινικά φάρμακα (Sagar et al., part 2, 2005, Yance et al., 2006).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων από τα ενεργά συστατικά του φυτού *Viscum album* είναι η επαγωγή οξειδωτικού στρες με επίκεντρο τα μιτοχόνδρια, από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Η ικανότητα των ROS να μεσολαβούν στο οξειδωτικό στρες κατά την διάρκεια των μαζικών κυτταρικών καταστροφών σχετίζεται με τη λιπιδιακή υπεροξειδωση, την απελευθέρωση από το μιτοχόνδριο προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών AIF και κυτοχρώματος C, απώλεια του μιτοχονδριακού δυναμικού Δψm και μείωση των αντιοξειδωτικών (π.χ. γλουταθειόνη) του κυττάρου.

Έρευνες δείχνουν ότι τα ενεργά συστατικά του φυτού *Viscum album* αυξάνουν σημαντικά την δραστικότητα του οξειδωτικού ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης και της καταλάσης, η οποία συμπεριφέρεται αντιοξειδωτικά, ενώ μειώνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης και των σχετικών ενζύμων (αναγωγάση της γλουταθειόνης και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) (Cebovic et al., 2008, Lavastre et al., 2005, Kim et al., 2004, Pevzner et al., 2004).

Επίσης, σύμφωνα με έρευνες, οι ενεργές ουσίες του φυτού ενεργοποιούν την κασπάση 3, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της αποδόμησης κάποιων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και την διακοπή του δικτύου της F-ακτίνης (Lavastre et al., 2005). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι

η απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων της σειράς PLB-985 επάγεται μέσω της αποδόμησης των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών λαμινίνης B1 (lamin B1), παξιλίνης (paxillin), βιμεντίνης (vimentin) και μέσω σχάσης της μη βαριάς μυϊκής αλυσίδας της μυοσίνης NMHC-IIA (Lavastre et al., 2007). Η ίδια διαδικασία παρατηρείται στα ουδετερόφιλα και τα ηοσινόφιλα (Lavastre et al., 2005).

Μελέτη που έγινε έδειξε ότι το εκχύλισμα του φυτού εμφανίζει μία ισχυρή εκλεκτικότητα στο μηχανισμό της φλεγμονής, επηρεάζοντας την έκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) και όχι της κυκλοξυγενάσης 1 (COX-1), η οποία επάγεται σαν απόκριση της φλεγμονής και συμμετέχει κυρίως στην επαγωγή της προσταγλανδίνης 2 (PGE-2), που λειτουργεί ως διαμεσολαβητικό μόριο επί πολλών ομοιοστατικών λειτουργιών. Το φυτό δρα αναστέλλοντας την ιντερφερόνη γ και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου α, που επάγουν την έκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 και η αναστολή αυτή γίνεται μέσω ενός μεγάλου εύρους κυτοκινών. Αυτή η ανασταλτική δράση του *Viscum album* στο επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών δείχνει ότι πιθανώς παρεμβαίνει στην διαδικασία της μετάφρασης, με αποτέλεσμα να επιδρά στην ποσοτική παραγωγή των πρωτεϊνών (Hegde et al., 2011).

Περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες για την πλήρη διευκρίνιση των συστατικών και των μηχανισμών δράσης του φυτού αυτού για την καλύτερη χρήση του στη θεραπεία των νεοπλασματικών νόσων.

1.5 Τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών (Trapp et al., 2001). Είναι λιπιδιακής φύσης και συνεπώς αδιάλυτα στο νερό. Μόρια της ομάδας αυτής συμμετέχουν στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, τα οποία λόγω της πικρής γεύσης τους, είτε λόγω της τοξικής τους δράσης, απομακρύνουν τα έντομα και τα θηλαστικά (War et al., 2012, Ibanez et al., 2012). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αιθέρια έλαια, τα οποία προσδίδουν ένα χαρακτηριστικό άρωμα στα φυτά (Ncube et al., 2008) καθώς και τα στεροειδή, τα οποία περιλαμβάνουν ποικίλα αντιβιοτικά και ορμόνες εντόμων (Speranza, 2010). Επίσης τα καροτενοειδή ανήκουν στην ομάδα των τερπενίων, τα οποία συμμετέχουν ως βοηθητικές χρωστικές στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

1.5.1 Βιοσύνθεση των τερπενίων

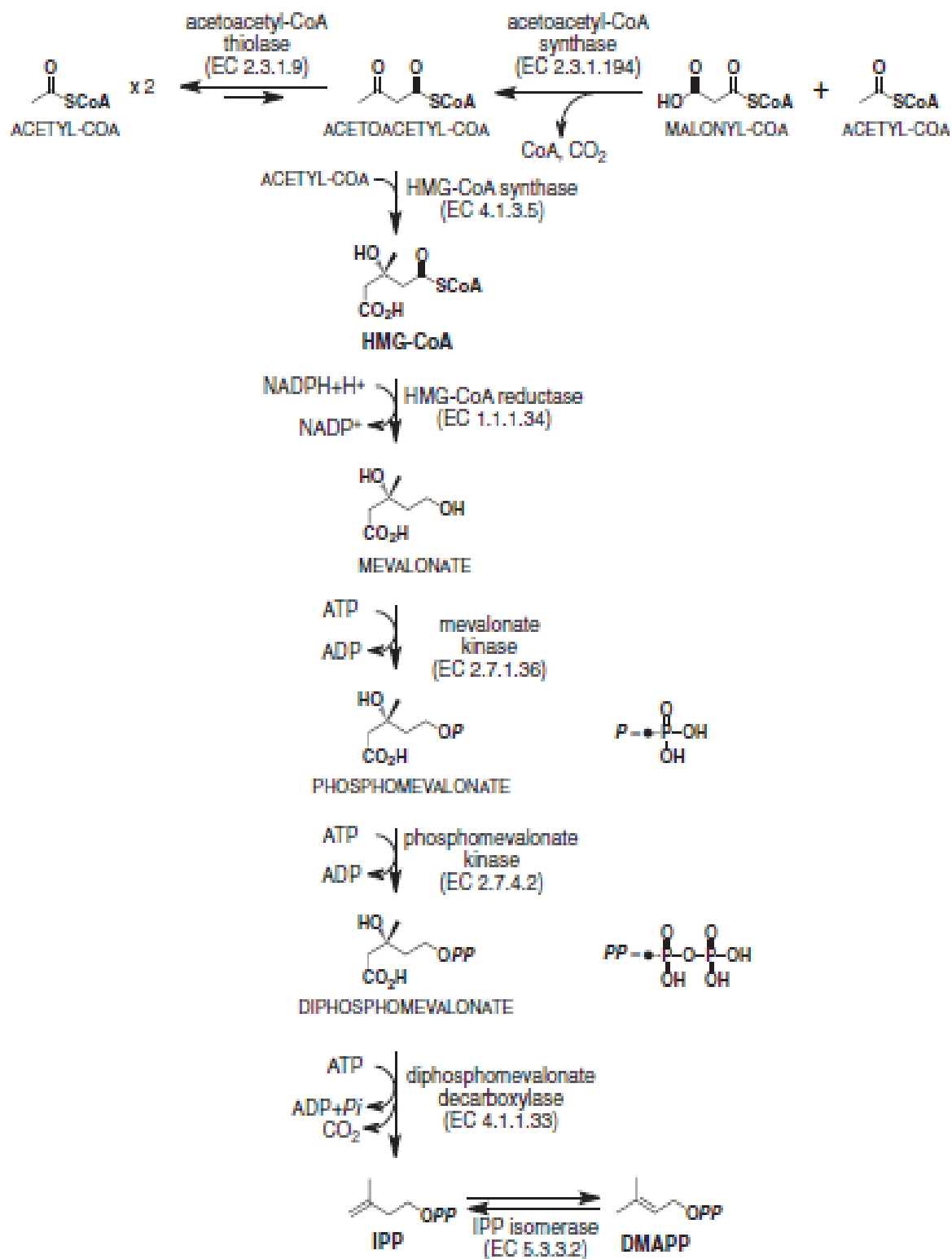
Η βιοσυνθετική προέλευση των τερπενίων είναι κοινή. Συντίθεται στα φυτά είτε μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (MVA) η οποία εδράζει στο κυτταρόπλασμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα υπεροξεισώματα είτε μέσω της εναλλακτικής οδού του 2- C- μεθυλ- D- ερυθριτολ- 4- φωσφορικού οξέος (MEP) που εδράζει στα πλαστίδια. Και στις δύο περιπτώσεις σχηματίζεται το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP), το οποίο μαζί με το ισομερές του πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP) είναι τα ενεργά, με 5 άτομα άνθρακα (C₅), δομικά συστατικά των τερπενίων (Eisenreich et al., 2004).

Η μεβαλονική οδός (MVA) (Σχήμα 1) ξεκινάει με την συμπύκνωση τριών μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α για τον σχηματισμό του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρικού-συνενζύμου Α (HMGCoA). Εν συνεχεία το ένζυμο HMGR (αναγωγή του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρικού-συνενζύμου Α) καταλύει τη μετατροπή του HMG-CoA σε MVA. Κατόπιν το MVA μετατρέπεται διαδοχικά σε IPP από τα ένζυμα MVA κινάση, φωσφομεβαλονική κινάση και MVA διφωσφορική αποκαρβοξυλάση.

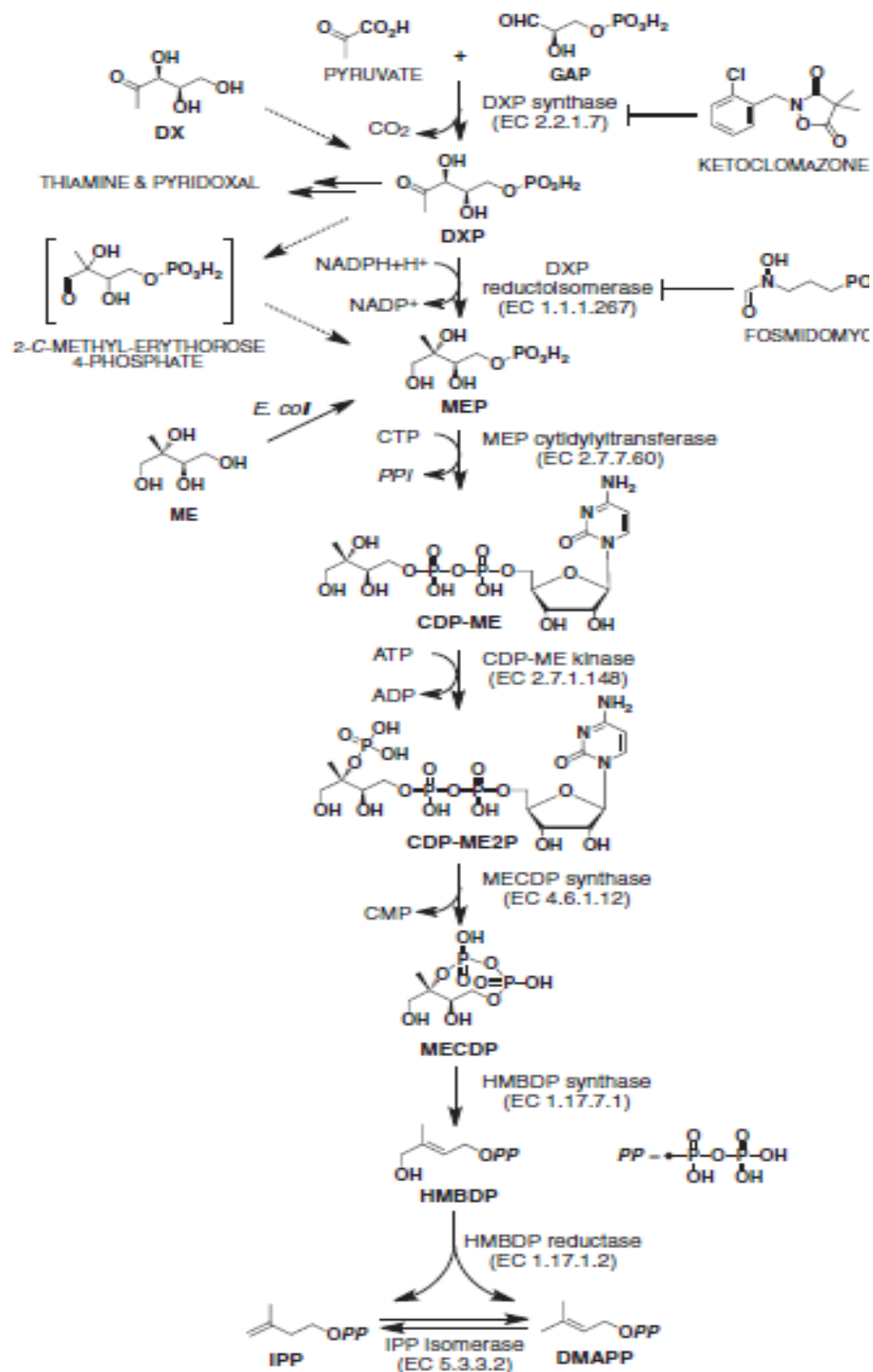
Η πλαστιδιακή MEP οδός (Σχήμα 2) ξεκινάει με την δημιουργία του 1-δεοξυ- d-ξυλουλόξη-5-φωσφορικού οξέος (DXP), από το πυροσταφυλικό οξύ και την 3-φωσφορική-D-γλυκεραλδεΐδη, μία αντίδραση που καταλύεται από την DXP συνθετάση (DXS). Στη συνέχεια, το DXP με τη δράση της DXP αναγωγώισομεράσης (DXR) μετατρέπεται σε 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικό οξύ (MEP). Ακολουθούν διαδοχικές συμπυκνώσεις τις οποίες καταλύουν διάφορα ένζυμα (κυτιδυλοτρανσφεράση του 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολ-4-φωσφορικού οξέος, 4-(κυτιδίνη-5'-διφωφο)-2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολική κινάση, 2-C-μεθυλ-D-ερυθριτολική 2,4-C-κυκλοδιφωσφορική συνθετάση, (E)-4- υδροξυ- 3- μεθυλ- βουτ-2-ενυλική διφωσφορική συνθετάση και (E)-4- υδροξυ-3-μεθυλ-βουτ-2-ενυλική διφωσφορική αναγωγή) και το τελικό προϊόν των αντιδράσεων αυτών είναι το IPP (Vishwakarma et al., 2012, Kuzuyama et al, 2012).

Το IPP και το DMAPP αντιδρούν και δίνουν το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP), από το οποίο συντίθενται σχεδόν όλα τα μονοτερπένια (10 άτομα άνθρακα). Εν συνεχεία, το GPP ενώνεται με άλλο ένα μόριο IPP για να δώσει το πυροφωσφορικό φαρνεζύλιο (FPP), το οποίο αποτελεί την πρόδρομη μορφή σχεδόν

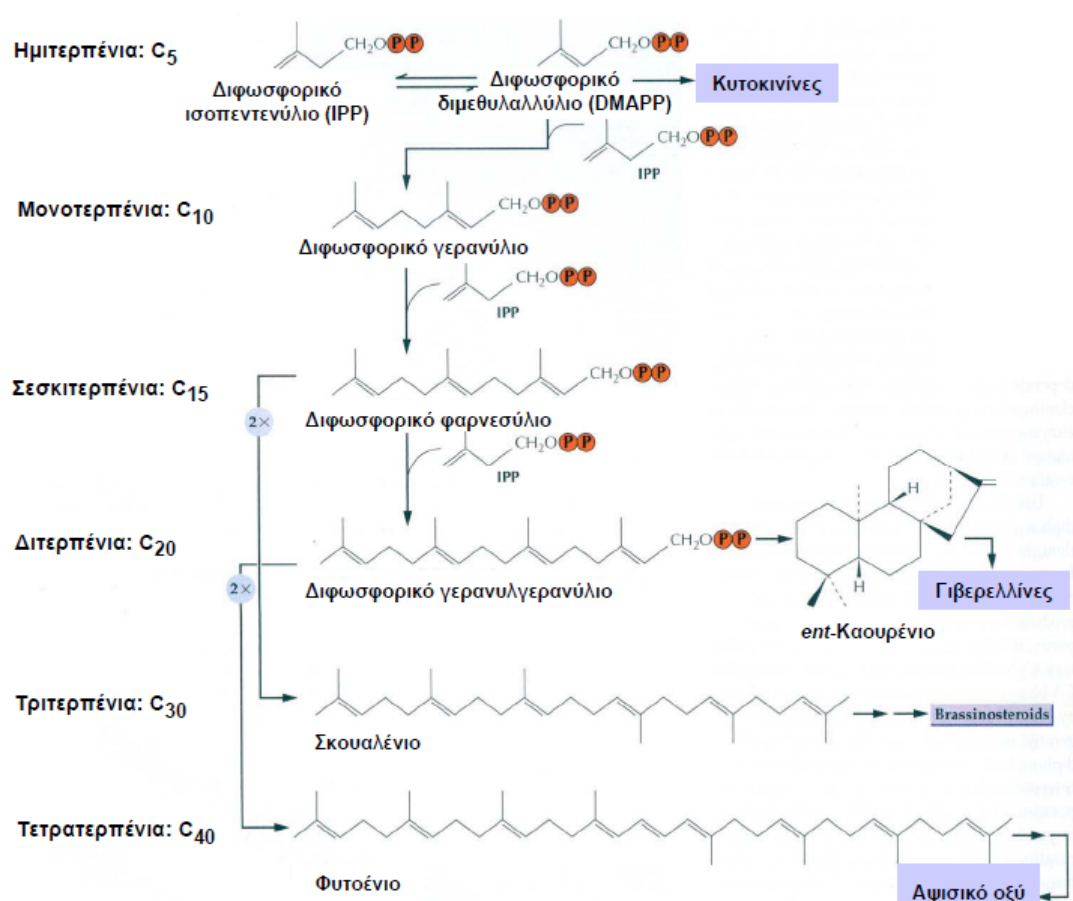
όλων των σεσκιτερπένιων (15 άτομα άνθρακα). Το FPP ενώνεται με άλλο ένα μόριο IPP και δίνει το πυροφωσφορικό γεράνυλο-γερανύλιο (GGPP), την πρόδρομη μορφή των διτερπένιων (20 άτομα άνθρακα). Η ένωση δύο μορίων FPP δίνουν το σκουαλένιο, πρόδρομο μόριο των τριτερπένιων (30 άτομα άνθρακα), ενώ η ένωση δύο μορίων GGPP δίνουν την πρόδρομη μορφή των τετρατερπένιων (40 άτομα άνθρακα), την φυτοΐνη (Σχήμα 3). Τερπένια με n αριθμό C5 ομάδων ονομάζονται πολυτερπένια (Degenhardt et al., 2009, Lange et al., 2013).



Σχήμα 1. Βιοσύνθεση πυροφωσφορικού ισοπεντενύλιου (IPP) και πυροφωσφορικού διμεθυλοαλύλιου (DMAPP) μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (MVA).



Σχήμα 2. Βιοσύνθεση πυροφωσφορικού ισοπεντενύλιου (IPP) και πυροφωσφορικού διμεθυλοαλύλιου (DMAPP) μέσω της 2- C- μεθυλ- D- ερυθριτολ- 4- φωσφορικού οξέος (MEP) οδού.



Σχήμα 3. Βιοσυνθετικό μονοπάτι όλων των τερπενίων.

1.5.2 Θεραπευτικές ιδιότητες των τερπενίων στον καρκίνο

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει για τις αντικαρκινικές ιδιότητες των τερπενίων. Είτε μόνα τους, είτε ως κύρια συστατικά διαφόρων εκχυλισμάτων, έχουν κυτταροτοξική δράση σε ποικίλες νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές.

Το μονοτερπένιο καμφένιο (camphene) έχει κυτταροτοξική δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά του παγκρέατος MIA PaCa-2 και δρα μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης επάγοντας την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 7 με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, αλλά θεωρείται ότι επάγει τον κυτταρικό θάνατο διαμέσου και άλλων μηχανισμών (Mulyaningsih et al., 2010). Το d-λιμονένιο (d-limonene), είναι ένα μονοτερπένιο το οποίο αναστέλλει τη χημική καρκινογένεση. Η μη τοξική φύση του, καθώς και η ικανότητα του να αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του όγκου το καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρον (Hudes et al., 2000). Η μυρτενάλη (myrtenal) είναι επίσης ένα μονοτερπένιο με αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς μειώνει τον ρυθμό

ανάπτυξης όγκου σε πειραματόζωα με καρκίνο του ήπατος. Επίσης αποτρέπει τις μεταβολές που προκαλούνται από τα καρκινικά κύτταρα στην αρχιτεκτονική του ιστού του ήπατος και στη δομή των κυττάρων (Babu et al., 2012). Άλλα μονοτερπένια με κυτταροτοξικές ιδιότητες είναι το α-πινένιο (α-pinene) και το β-πινένιο (β-pinene), τα οποία ασκούν δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές των ωοθηκών SK-OV-3 και HO-8910 και στην καρκινική σειρά του ήπατος Bel-7402 (Wang et al., 2012). Επίσης το α-πινένιο εμφανίζει υψηλή κυτταροτοξική δράση και στην ερυθρολευχαιμική σειρά K562 (Lampronti et al., 2006).

Η γκοσσυπόλη (gossypol) είναι ένα σεσκιτερπένιο το οποίο αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη PC3 και προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. *In vivo*, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει το ρυθμό ανάπτυξης όγκου, επάγοντας την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 8 και μειώνοντας την έκφραση των Bcl-2 γονιδίων (Zhang et al., 2010). Το σεσκιτερπένιο φαρνεζόλη (farnesol) έχει επίσης κυτταροτοξική δράση στην λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM C1 και φαίνεται ότι αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, επάγει την κατακρήμνιση του DNA και οδηγεί σε αποπτωτικό θάνατο (Voziyan et al., 1995). Το σεσκιτερπένιο αυτό, καθώς και το λυκοπένιο το οποίο ανήκει στα καροτενοειδή, φέρουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες όπως αποδείχθηκε σε *in vivo* μελέτη, καθώς αναστέλλουν τη δράση των πρόδρομων ανώμαλων κρυφών εστιών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου (Wargovite et al., 2000). Στην ομάδα των σεσκιτερπενίων ανήκει και η βομιφολιόλη (vomifoliol), η οποία έχει κυτταροτοξική δράση στην καρκινική σειρά του παχέος εντέρου COLO-205, στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος Hep G2 και στα λευχαιμικά κύτταρα HL-60 (Bai et al., 2011).

Το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Peperomia pellucid*, το οποίο περιέχει 37,88% το διτερπένιο φυτόλη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 (Wei et al., 2011). Επίσης τα αιθέρια έλαια του φυτού *Solanum spirale* τα οποία περιέχουν 48% φυτόλη έχουν κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές σειρές KB (καρκίνος του στόματος), MCF-7 (καρκίνος του μαστού) και NCI-H187 (καρκίνος του πνεύμονα) (Keawsard et al., 2012). Επιπλέον, το εκχύλισμα και τα διτερπένια της ελληνικής πρόπολης έχουν αυξημένη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HT-29 χωρίς να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα. Το συστατικό του εκχυλίσματος με την

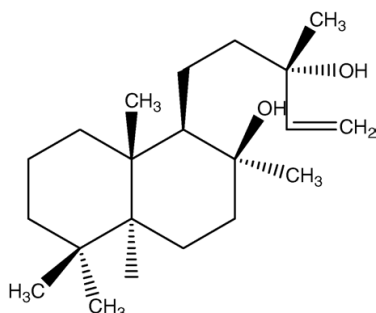
ισχυρότερη δράση είναι το διτερπένιο μανοόλη (manool), η οποία αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M (Watanabe et al., 2011).

Κυτταροτοξικές ιδιότητες φέρουν και τα τριτερπένια, όπως η β-αμυρίνη (β-amyrin) η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων A549, MCF-7, HL-60 και LLC (Thao et al., 2010). Επίσης το τριτερπένιο λουπεόλη (lupeol) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πρόιμων μελανωματικών κυττάρων WM35 και των μεταστατικών μελανωματικών κυττάρων 451Lu ενώ είναι λιγότερο τοξικό στα φυσιολογικά μελανοκύτταρα NHM. Έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1/S και να οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο. Επίσης προκαλεί μειорύθμιση της πρωτεΐνης Bcl-2 και ενεργοποιεί την κασπάση 3 (Saleem et al., 2008). Το ολεανολικό (oleanolic acid) και το ουρσολικό οξύ (ursolic acid), είναι επίσης δύο τριτερπένια με δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση σε ποικίλες κυτταρικές σειρές (Juan et al., 2008, Chen et al., 2012, He et al., 2007). Έχει αποδειχθεί ότι οδηγούν σε αποπτωτικό θάνατο τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος HuH7 μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, καθώς επίσης καταστέλλουν τη δράση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και ρυθμίζουν την έκφραση mRNA της αποπτωτικής πρωτεΐνης XIAP (Shyu et al., 2010).

Επίσης τα οξεϊκά τριτερπένια, δηλαδή η οξεϊκή α-αμυρίνη (a-amyrin acetate), η οξεϊκή β-αμυρίνη (b-amyrin acetate) και η οξεϊκή λουπεόλη (lupeol acetate) δρουν προστατευτικά ενάντια στη χημική καρκινογένεση και έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, δεδομένου ότι μειώνουν τα επίπεδα της προσταγλανδίνης E2 μέσω μηχανισμών που αναστέλλουν την έκφραση της κυκλοξυγενάσης 2 και την παραγωγή πρωτεϊνικών κινασών, ενώ μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) (Akihisa et al., 2010).

Τα στεροειδή τριτερπένια, όπως η εργοστερόλη, η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε ποικίλες νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές (Baskar et al., 2010, Lee et al., 2009, Teh et al., 2012). Επιπλέον, σε *in vivo* μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η σιτοστερόλη έχει την ικανότητα να μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης του όγκου καθώς επίσης μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης όγκου μέσω χημικής καρκινογένεσης (Awad et al., 2000).

1.6 Σκλαρεόλη



Σχήμα 3. Δομή σκλαρεόλης

Η σκλαρεόλη (Σχήμα 3) είναι ένα λαβδανικό διτερπένιο το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα φύλλα του φυτού *Salvia officinalis* L., του γένους *Salvia*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Lamiaceae (Labiatae). Τα αιθέρια έλαια του φυτού αυτού χρησιμοποιούνται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων και καπνού για την ενίσχυση της γεύσης και για την παρασκευή αφεψημάτων και λικέρ. Επίσης χρησιμοποιούνται ως αρωματικά συστατικά των σαπουνιών, των απορρυπαντικών, των κρεμών σώματος, των λοσιόν και των διαφόρων τύπων αρωμάτων στην αρωματοποιία, καθώς και στην παραδοσιακή ιατρική (Çulhaoğlu et al., 2013, Kouzi et al., 2013). Θεωρείται ότι επιδρούν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και κυρίως στο επίπεδο του θαλάμου του εγκεφάλου, τροποποιώντας τις λειτουργίες των πυρήνων του, με τρόπο όμοιο με εκείνο των αιθέριων ελαίων του γκρέιπφρουτ, του τριαντάφυλλου και του γιασεμιού. Η δράση των ουσιών που εμπεριέχονται στα εν λόγω αιθέρια έλαια είναι πολύμορφη και σχετίζεται από μια σειρά από νευρολογικά φαινόμενα, όπως οι συγκινησιακές αντιδράσεις απέναντι στην επιβράβευση ή την τιμωρία, την κατάσταση της επαγρύπνησης, τον πόνο, την αγωνία κ.α. Επίσης θεωρείται ότι καταπραΰνουν διάφορες μορφές άγχους, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν φοβίες, παράνοιες και παραισθήσεις (Kintzios et al., 2006).

Λόγω της μεγάλης αφθονίας της στην φύση, οι βιομηχανίες τροφίμων και αρωμάτων ασχολούνται από το 1950 με την δημιουργία συνθετικών μορίων βασιζομένων στη δομή του ανθρακικού της σκελετού (Belon et al., 1963, Ferreiro-Mederos et al., 2009, Vlad et al., 2013, Vlad, 1982). Το πιο διαδεδομένο παράγωγο

της είναι το Ambrox., ένα βασικό ενεργό συστατικό του άμπαρι (ambergri) με ιδιαίτερο άρωμα το οποίο επίσης χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και ως ενισχυτικό γεύσης, αλλά η παραγωγή του είναι περιορισμένη λόγω του ότι προέρχεται από τα έντερα του κήτους φουσητήρας (Schalk et al., 2012, Gónnewich et al., 2012). Επίσης έχει πραγματοποιηθεί, ξεκινώντας από τη σκλαρεόλη, η σύνθεση ορισμένων μορίων τα οποία φέρουν βιολογικές ιδιότητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες, με σημαντική αντικαρκινική και ανθελονοσιακή δράση. Τα παράγωγα αυτά της σκλαρεόλης είναι το (+)-σουμπερικό οξύ [(+)-suberic acid], το E-ρινοκεροτινοϊκό οξύ (E-rhinocerotinoic acid) και το (-)-15-οξοπου-ουεχενόλη [(-)-15-oxo-urephenol] (Fekih et al., 2006, Frija et al., 2011).

1.6.1 Βιολογικές ιδιότητες της σκλαρεόλης

Οι βιολογικές ιδιότητες της σκλαρεόλης είναι πολλές. Οι πλέον γνωστές και διαδεδομένες είναι οι ακόλουθες:

1^{ov}) *Δράση αντιβιοτική*: Η σκλαρεόλη παρουσιάζει αντιμυκητιακή (Vlad et al., 1992) και, εν γένει, αντιμικροβιακή δράση (Wu et al., 2012).

2^{ov}) *Δράση αντιαιζίνης στα φυτά*: δρα ως αναστολέας της ανάπτυξης των φυτών.

3^{ov}) *Εντομοαπωθητικός παράγοντας*: μέσω κατάλληλων παρεμβάσεων στο μόριο της (όπως γλυκοζυλίωση στον C-18) λειτουργεί εντομοαπωθητικά (Kouzi et al., 2013).

4^{ov}) *Δράση αναστολής της χοληνεστερασικής δραστηριότητας*: δρα αντι-χοληνεστερασικά, καθώς αναστέλλει την ακετυλοχοληνεστεράση και την βουτυρυλοχοληνεστεράση και αυτή η ιδιότητα της την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στη θεραπεία της νόσου του Alzheimer (Çulhaoğlu et al., 2013).

5^{ov}) *Αντικαρκινικές δράσεις in vitro*: Η σκλαρεόλη, είτε στην ελεύθερη μορφή της είτε μεταφερόμενη μέσω λιποσωμάτων, έχει χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση σε ποικίλες λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (CEM, MOLT4, RPMI 822, HL60, NCI-H460, NCI-H23, DMS114, SHP77), στα καρκινικά ηπατικά κύτταρα SNI2KI και SN12C, στα HT29, DLD1, HCT116, HCT116 p53-/- καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, στα UACC62 και LOX-IMVI κύτταρα μελανώματος, στα MDA-MB435, MDA-MB231 και MCF7 καρκινικά

κύτταρα του μαστού, στα PC3, DU145, U251, SF-295 και SF268 καρκινικά κύτταρα του προστάτη και στα OVCAR3, OVCAR5 και SKOV3 καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών, ενώ στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PMBC) η κυτταροτοξικότητα της είναι αρκετά μικρή (Mahaira et al., 2011). Η δράση της αυτή είναι μεγαλύτερη στις περισσότερες νεοπλασματικές σειρές μέσω της ελεύθερης μορφής της σε σχέση με την λιποσωμική της. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της σκλαρεόλης να διαπερνά αμέσως την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα του κυττάρου και να απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα λιποσώματα επωάζονται για ορισμένο χρονικό διάστημα στην κυτταρική μεμβράνη και έπειτα απελευθερώνονται σε αυτό (Paradissis et al., 2007).

Έχει αποδειχθεί ότι η σκλαρεόλη λειτουργεί μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης, ο οποίος σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 9 και αργότερα της κασπάσης 3 (Dimas et al., 2007). Επίσης η δράση της είναι ανεξάρτητη της έκφρασης του γονιδίου p53. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι έχει την ικανότητα να ενισχύει την κυτταροτοξική δράση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων δοξορουβικίνη και ετοποσιδίου έναντι των καρκινικών κυττάρων (Dimas et al., 2006).

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η σκλαρεόλη, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις (10μg/ml), δεν έχει κυτταροτοξική δράση στα μακροφάγα παρουσία ενός λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Επίσης έχει την ικανότητα να αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου ρυθμίζοντας έτσι σε γονιδιακό επίπεδο ένα σύνολο σημαντικών λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται η συγκεκριμένη συνθετάση (Huang et al., 2012). Το μονοξείδιο του αζώτου (ή Ενδοθηλιακός Παράγοντας Χάλασης Αγγείων) είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης του αγγειακού ενδοθηλίου ο οποίος δρα αναστέλλοντας την συστολή των λείων μυϊκών ινών των αγγείων με αποτέλεσμα την αύξηση του αυλού τους και την διευκόλυνση της αιματικής ροής. Επίσης, όταν παράγεται σε κατάλληλες ποσότητες και με κατάλληλους ρυθμούς αποτελεί ένα σημαντικό μόριο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αναπνοή, η κυτταρική μετανάστευση, η ανοσοαπόκριση και η απόπτωση. Η συνεχής παραγωγή του όμως σχετίζεται με τον καρκίνο καθώς και άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Φαίνεται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης, του κυτταρικού κύκλου, της αγγειογένεσης, της διήθησης και της μετάστασης. Έχει την ικανότητα να δημιουργεί τοξικά και μεταλλαξιγόνα μόρια ως

ελεύθερη ρίζα, να αναστέλλει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, να αναστέλλει την απόπτωση, να ενεργοποιεί τα ογκογονίδια και την αγγειογένεση και να ρυθμίζει την παραγωγή των προσταγλανδινών (Jaiswal et al., 2001, Korde et al., 2012).

Επίσης η σκλαρεόλη είναι σε θέση να αναστείλει την έκφραση της επαγόμενης κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) σε ενεργοποιημένα μακροφάγα λευκοκύτταρα, να μειώνει το οίδημα της ουράς που προκαλεί η τοπική έγχυση καραγενάνης στον αρουραίο, να ελαττώνει την περιεκτικότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στους ιστούς, να μειώνει τα επίπεδα του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF- α), όπως επίσης να ελαττώνει τις συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΰδης (MDA) με τρόπο όμοιο με εκείνο της ινδομεθακίνης σε συγκεντρώσεις των 10 mg/kg. Η μηλονική διαλδεΰδη, αποτελεί ένα από τα τελικά προϊόντα τόσο της αραχιδονικής οδού, όσο και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (λιποϋπεροξειδωση) (Tsikas et al., 2012), ενώ η ινδομεθακίνη ως αντιφλεγμονώδης αναστέλλει την παραγωγή της, μέσω της αναστολής του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Ωστόσο αν και η σκλαρεόλη δεν έχει χαρακτηριστικά αντιφλεγμονώδους παράγοντα, εν τούτοις μέσω κάποιου μηχανισμού μειώνει την παραγωγή της μηλονικής διαλδεΰδης, με τρόπο ανάλογο της ινδομεθακίνης. Επίσης μειώνει ισχυρά την διήθηση των ιστών από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα έπειτα από ιστική διέγερση προκαλούμενη μέσω χορήγησης καραγενάνης, φαινόμενο που ερμηνεύει την μείωση της εξοίδησης της ουράς του αρουραίου που ήδη προαναφέραμε. Πιθανόν αυτή η δράση οφείλεται στην μείωση των κυτοκινών της φλεγμονής και στην αύξηση την ενζυμικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Huang et al., 2012).

Επίσης η 13-epi-sclareol, ένα επιμερές της σκλαρεόλης, λαβδανικό διτερπένιο, έχει και αυτό κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και στην κυτταρική σειρά Ishikawa (η οποία προέρχεται από το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου το οποίο εκφράζει οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς) ενώ η κυτταροτοξική της δράση στα κύτταρα Vero (που προέρχονται από τους φυσιολογικούς νεφρούς του Αφρικανικού πράσινου πιθήκου) και σε πρωτογενή οστεοβλαστικά κύτταρα είναι μικρότερη από εκείνη της ταξόλης. Η δράση της είναι δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη και ακολουθεί το μονοπάτι της απόπτωσης (Sashidhara et al., 2007).

In vivo μελέτες δείχνουν πως η χορήγηση της σκλαρεόλης μέσω της μορφής των λιποσωμάτων σε καρκινοπαθή πειραματόζωα προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ στην ελεύθερη μορφή της προκαλεί θάνατο άνω του 50% των πειραματόζωων έπειτα από 24 ώρες (Hatziantoniou et al., 2006, Mahaira et al., 2011). Αντιθέτως έχει αποδειχθεί ότι η άμεση χορήγηση της σκλαρεόλης στο εσωτερικό του όγκου σε πειραματόζωα με εμφυτευμένο τμήμα όγκου προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης του (Noori et al., 2010).

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, η σκλαρεόλη φέρει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όχι μόνο για τις ενισχυτικές της ιδιότητες στη γεύση των τροφίμων και του ιδιαίτερου αρώματος της, αλλά και για τις βιολογικές της δράσεις, εφόσον φέρει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες σε ποικίλες νεοπλασματικές σειρές και ασθενή κυτταροτοξική δράση στα φυσιολογικά κύτταρα.

1.7 Σκοπός της διατριβής

Έχει αποδειχθεί ότι οι λεκτίνες και οι βισκοτοξίνες του φυτού *Viscum album* έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα, αλλά υπάρχουν και άλλα ποικίλα χημικά συστατικά, χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία επίσης προσδίδουν κυτταροτοξικές ιδιότητες στο φυτό, τα οποία δεν έχουν μελετηθεί πλήρως (Zarkovic et al., 2001).

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η απομόνωση και η μελέτη των λιπιδιακών συστατικών του φυτού *Viscum album*. Κατόπιν, το λιπιδιακό συστατικό που παρουσιάζει κατ' επανάληψη την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα νεοπλασματικά κύτταρα και την ασθενέστερη στα φυσιολογικά κύτταρα ταυτοποιείται και μελετάται περαιτέρω η αντικαρκινική του δράση.

Επειδή παρατηρήθηκαν μεταβολές στη σύσταση των λιπιδιακών ουσιών του φυτού, καθώς επίσης και μεταβολές των κυτταροτοξικών ιδιοτήτων τους ανάλογα με την εποχή συγκομιδής, αποφασίστηκε να μελετηθεί και αυτός ο παράγοντας. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση το λιπιδιακό συστατικό που παρουσίαζε κατ' επανάληψη την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα νεοπλασματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια δύο διαφορετικών εποχών συγκομιδής, της καλοκαιρινής και της χειμερινής.

Έπειτα από την ταυτοποίηση του λιπιδιακού συστατικού, οι περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες διεξάχθηκαν με το δομικά ανάλογο του που υπάρχει στο εμπόριο. Η δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση της δομικά ανάλογης ουσίας μελετήθηκε σε διάφορες νεοπλασματικές σειρές καθώς και σε φυσιολογικά κύτταρα *in vitro*. Επιπλέον μελετήθηκε ο μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που ακολουθούν τα κύτταρα έπειτα από επώαση τους με την ουσία αυτή καθώς επίσης και εάν η αναστολή που προκαλεί στον πολλαπλασιασμού τους είναι μη αναστρέψιμη.

Ο ρόλος του λιπιδιακού συστατικού στην αιμοπεταλιακή συσσώρευση προσδιορίστηκε *ex vivo*, ενώ μέσω των *in vivo* πειραματικών διεργασιών μελετήθηκε η τοξική του δράση στους ιστούς και τα όργανα υγιών πειραματόζωων, έπειτα από οξεία και χρόνια χορήγηση του. Επίσης προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις της ουσίας οι οποίες είναι σε θέση να χρησιμοποιηθούν φαρμακολογικά. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η ικανότητα της ουσίας αυτής να αναστείλει ή και να μειώσει τον ρυθμό

ανάπτυξης σαρκωματικών όγκων σε πειραματόζωα, έπειτα από ενοφθαλμισμού λειομυοσαρκωματικών κυττάρων επίμυος Wistar, καθώς επίσης και εάν η ουσία είναι σε θέση να αυξάνει το προσδόκιμο του χρόνου επιβίωσης των πειραματόζωων αυτών με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως αντινεοπλασματικός παράγοντας.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το υποείδος του φυτού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν το *Viscum album ssp. abietis*, το οποίο συλλέχθηκε από δέντρα-ξενιστές του είδους *Abies alba*, από περιοχή της Ηπείρου, κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής (Ιούνιος-Ιούλιος) και της χειμερινής (Δεκέμβριος-Ιανουάριος) περιόδου των ετών 2010-2013. Η ταυτοποίηση του φυτού έγινε από τον Δρ. Παναγιώτη Ευθυμιάδη, καθηγητή Γεωργίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα εξής:

- TLC silica gel 60 plates, Merck
- Χλωροφόρμιο, Fisher
- Μεθανόλη, Fisher
- Πετρελαϊκός αιθέρας, Fisher
- Αιθανόλη, Sigma
- Διεθυλαιθέρας, Fisher
- Οξικό οξύ, Panreac
- Ισοπροπανόλη, Fisher
- Σκλαρεόλη, Sigma
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Riedel-de Haen
- Βορικό οξύ, Riedel-de Haen
- Υδροχλωρικό οξύ, Riedel-de Haen
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt-2-hydrate (EDTA), Riedel-de Haen
- Διχρωμικό κάλιο, Merck
- Πυκνό θειικό οξύ (H₂SO₄, 36N) Merck
- Εικοσιεννεάνιο (cis-9-tricosene), Sigma
- Τρικαπριλίνη, Sigma

- Εστέρας της χοληστερόλης, Sigma
- Χοληστερόλη, Sigma
- Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM), PAA
- Εμβρυικός βόειος ορός (FBS), PAA
- L-γλουταμίνη, PAA
- Πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη, PAA
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), Sigma
- Trypsin-EDTA, 0,05%/0,02%, PAA
- Dimethyl sulfoxide (DMSO), Riedel-de-Haen
- Triazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), Sigma
- Trypan blue solution, Sigma
- Annexin V-Fluorescein isothiocynate (FITC), BD Biosciences
- Propidium iodide (PI), Sigma
- Adenosine diphosphate (ADP), Sigma
- Platelet activating factor (PAF), Sigma
- Giemsa Stain Modified Solution, Riedel-de Haen
- Αγαρόζη, Sigma
- Πρωτεΐνάση K, Sigma
- RNase A, Sigma
- DNA lysis buffer, BD Pharmingen
- Χλωριούχο νάτριο, Riedel-de Haen
- Χλωριούχο ασβέστιο, Merck
- HEPES solution, Sigma
- Υδροξείδιο του νατρίου, Riedel-de Haen
- Βρωμιούχο αιθίδιο, Sigma
- Κεταμίνη, Imalgene
- Μιδαζολαμίνη (Dormicum), Roche
- Φορμαλδεΰδη, Riedel-de Haen
- Σύριγγες 1ml, 25G, BD
- Χειρουργικά ράμματα 7-0 mersilk, 45cm, Johnson & Johnson

2.2 Εκχύλιση των λιπιδιακών συστατικών του φυτού *Viscum album*

Τα λιπίδια έχουν την τάση να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες και τους υδρογονάνθρακες, μέσω των δεσμών van der Waals. Διάφοροι διαλύτες ή συνδυασμοί διαλυτών έχουν προταθεί ως εκχυλιστικά μέσα, οι οποίοι σπάνε τους δεσμούς αυτούς και καθίσταται ο διαχωρισμός των λιπιδιακών συστατικών εφικτός. Η μέθοδος των Bligh και Dyer ή η τροποποίηση αυτής (Bligh et al., 1959), θεωρείται η καλύτερη μέθοδος διαχωρισμού των πολικών και μη πολικών συστατικών κατά την οποία χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης, το χλωροφόρμιο και ένας πολικός διαλύτης, η μεθανόλη. Η μέθοδος αυτή είναι απλή και οικονομική και καθιστά εφικτό το διαχωρισμό των λιπιδιακών συστατικών ιστών με χαμηλή περιεκτικότητα λιπιδίων. Επίσης, μέσω της μεθόδου αυτής αποτρέπεται η απώλεια των λιπιδιακών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους και διατηρείται η ακεραιότητα των λιπιδίων καθώς δεν υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία (Iverson et al., 2001).

Ο διαχωρισμός των λιπιδιακών συστατικών του φυτού με τροποποίηση της μεθόδου Bligh-Dyer πραγματοποιείται ως εξής:

- 20g φρέσκων φύλλων του φυτού *Viscum album ssp. abietis* από κάθε εποχή συγκομιδής (χειμερινής και καλοκαιρινής) τεμαχίζονται και πολτοποιούνται σε γουδί για την λύση των φυτικών κυττάρων.
- Κατά τη διάρκεια της πολτοποίησης προστίθενται διαδοχικά στο γουδί 10ml δισαπεσταγμένο νερό, 20ml μεθανόλη και 10 ml χλωροφόρμιο.
- Το εκχύλισμα που προκύπτει τοποθετείται σε κωνική φιάλη, το γουδί ξεπλένεται με 10ml δισαπεσταγμένο νερό και 10ml χλωροφόρμιο και το διάλυμα προστίθεται στην κωνική φιάλη.
- Κατόπιν το εκχύλισμα διηθείται υπό κενό από ηθμό πορώδους πορσελάνης στον οποίο έχει τοποθετηθεί στρώμα αδρανούς υλικού (celite) πάχους 2-3mm.
- Το διηθημένο εκχύλισμα τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη και παραμένει χωρίς ανατάραξη για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων.
- Έπειτα συλλέγονται τα κλάσματα που προκύπτουν (χλωροφορμικό και υδατομεθανολικό).

- Το υπόλειμμα στην κωνική φιάλη κατεργάζεται με 15ml χλωροφορμίου, 10ml δισαπεσταγμένο νερό και 10ml μεθανόλης και διηθείται υπό κενό όπως προηγούμενως.
- Το νέο διηθημένο εκχύλισμα τοποθετείται επίσης σε διαχωριστική χοάνη και παραμένει έως ότου επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων.
- Τα κλάσματα που προκύπτουν προστίθενται στα προηγούμενα και ογκομετρούνται.
- 10ml του χλωροφορμικού κλάσματος εξατμίζονται σε εξατμιστήρα κενού σύμφωνα με τη μέθοδο Galanos-Karoulas (Galanos et al., 1962) σε θερμοκρασία 40 °C.
- Το ίζημα που προκύπτει αναδιαλύεται με 20ml πετρελαϊκού αιθέρα και 20ml αιθανόλης 87%.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εφόσον έχει πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο κλασμάτων (αιθανολικό και αιθερικό), αυτά συλλέγονται και ογκομετρούνται.

Όλα τα κλάσματα που προέκυψαν από τα φρέσκα φύλλα του φυτού προφυλάσσονται από την οξείδωση με τη δημιουργία ενός στρώματος αδρανούς αερίου (άζωτο) πάνω από αυτά και αποθηκεύονται στους -20°C. Η οξείδωση ενός κλάσματος γίνεται αντιληπτή από τη μεταβολή του χρώματος του, από την δυσδιάλυτη φύση του και από την μειωμένη κυτταροτοξικότητα του. Σε περίπτωση οξείδωσης, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται από την αρχή.

2.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μία μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Για τον διαχωρισμό των λιπιδιακών συστατικών, ως στατική φάση χρησιμοποιείται το πυριτικό οξύ, το οποίο είναι ισχυρά πολικό και προσκολλάται ως λεπτή στιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα. Ως κινητή υγρή φάση χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες, οι οποίοι διαβρέχουν την λεπτή στιβάδα του πυριτικού οξέος και λόγω τριχοειδών φαινομένων

κινούνται κατακόρυφα. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πλάκα, τα συστατικά του μίγματος που αναλύεται μετακινούνται κατακόρυφα προς την απέναντι πλευρά της πλάκας με διαφορετικές ταχύτητες, παρασυρόμενα από την κινητή φάση. Τα συστατικά εκείνα τα οποία έχουν μεγάλη χημική συγγένεια με τη στατική φάση συγκρατούνται από αυτήν, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με μικρότερες ταχύτητες. Αντιθέτως, τα συστατικά εκείνα τα οποία έχουν μικρή χημική συγγένεια με τη στατική φάση, συγκρατούνται λιγότερο, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με γρηγορότερους ρυθμούς. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Το χειμερινό και το καλοκαιρινό λιπιδιακό κλάσμα του φυτού με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση χρωματογραφείται σε πλάκα TLC silica gel 60.
- Κατάλληλη ποσότητα του κλάσματος από κάθε εποχή εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου ώστε να προκύψει ίζημα βάρους 5mg.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 0,5ml χλωροφορμίου και τοποθετείται στην χρωματογραφική πλάκα.
- Σαν πρότυπα χρησιμοποιούνται το εικοσιεννεάνιο (cis-9-tricosene), η χοληστερόλη (cholesterol), ο εστέρας της χοληστερόλης (cholesteryl oleate) και η τρικαπριλίνη (glyceryl trioctanoate), τα οποία διαλύονται επίσης σε χλωροφόρμιο (1mg/ml) και 20μl του μίγματος τους τοποθετούνται στην χρωματογραφική πλάκα.
- Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων η χρωματογραφική πλάκα τοποθετείται σε θάλαμο ανάπτυξης για 1 ώρα, ο οποίος περιέχει 90ml πετρελαϊκό αιθέρα, 10ml διεθυλαιθέρα και 1ml οξικό οξύ και έχει κορεστεί.
- Κατόπιν η χρωματογραφική πλάκα στεγνώνεται και τοποθετείται μέσα σε θάλαμο που περιέχει ατμούς ιωδίου για 2-3 λεπτά, ούτως ώστε να εμφανιστούν οι κηλίδες και οι ζώνες των δειγμάτων που είχαν τοποθετηθεί προηγουμένως.
- Με μολύβι σχεδιάζεται το μέτωπο των διαλυτών, οι κηλίδες, καθώς και οι ζώνες που εμφανίζονται οι οποίες κατόπιν αποζαίνονται.
- Επίσης υπολογίζεται η τιμή RF κάθε ζώνης και προτύπου.

Για την απομόνωση των λιπιδιακών συστατικών που βρίσκονται προσκολλημένα στο πυριτικό οξύ ακολουθείται η τροποποίηση της μεθόδου Bligh-Dyer (Bligh et al., 1959):

- Σε κάθε δείγμα προστίθενται 2ml δισαπεσταγμένο νερό, 2ml χλωροφόρμιο και 4ml μεθανόλη.
- Το διάλυμα που προκύπτει φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 20 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και το ίζημα απορρίπτεται.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται 2ml δισαπεσταγμένο νερό και 2ml χλωροφόρμιο και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 3000 στροφές.
- Από το διφασικό διάλυμα που προκύπτει σε κάθε δείγμα, απορρίπτεται η άνω φάση ενώ η κάτω φάση, η χλωροφορμική, περιέχει το λιπίδιο που απομονώθηκε και φυλάσσεται στους -20°C , προστατευόμενο με στρώμα αδρανούς αερίου (άζωτο) για την αποφυγή της οξείδωσης του μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Επίσης αποφεύγεται η συνεχής ψύξη και απόψυξη τους.

Η οξείδωση των λιπιδιακών συστατικών γίνεται αντιληπτή αρχικά από τη μειωμένη κυτταροτοξική τους δράση με την πάροδο του χρόνου, έπειτα από την δυσκολία στη διαλυτοποίησή τους και τέλος από τη μεταβολή του χρώματος τους. Σε περίπτωση οξείδωσης, η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται από την αρχή. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι λόγω της ευαισθησίας των ουδέτερων λιπιδιακών συστατικών και παρόλο που οι συνθήκες φύλαξης τους τηρούνταν με αυστηρότητα, υπήρχαν συχνά φαινόμενα οξείδωσης. Για την αποφυγή όλων όσων αναφέρθηκαν, οι περαιτέρω πειραματικές διεργασίες με τα απομονωμένα λιπιδιακά συστατικά πραγματοποιούνται εντός σύντομου χρονικού διαστήματος.

2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των απομονωμένων λιπιδιακών συστατικών

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση άγνωστων ποσοτήτων λιπιδιακών συστατικών, τα οποία προσδίδουν διαφορετικές χρωματικές διακυμάνσεις στο οξειδωτικό μέσο στο οποίο βρίσκονται, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους και συγκρίνονται φασματοφωτομετρικά με τις χρωματικές διακυμάνσεις που προκαλεί η

οξείδωση ενός ήδη γνωστού λιπιδιακού συστατικού, το οποίο λειτουργεί ως πρότυπο (Skipiski et al., 1969). Η διαδικασία του ποσοτικού προσδιορισμού έχει ως εξής:

- Εξατμίζονται 0,050ml, 0,100ml, 0,250ml, 0,500ml, 1ml και 2ml του χλωροφορμικού διαλύματος που περιέχει κάθε λιπίδιο που απομονώθηκε από την TLC σε ρεύμα αζώτου.
- Τα ιζήματα που προκύπτουν επαναιωρούνται σε 2ml διχρωμικού άλατος. Το διχρωμικό άλας παρασκευάζεται με την προσθήκη 1,25g διχρωμικού καλίου σε 500ml θειϊκού οξέος 36N.
- Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 45 λεπτά στους 95°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3000 στροφές.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης λαμβάνεται 1ml από κάθε δείγμα και προστίθενται 10ml νερού.
- Ακολουθεί φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο (UV-Visible spectrophotometer, Shimadzu) στα 350nm.
- Ακολουθείται η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας 25μg, 50μg, 100μg, 125μg, 150μg, 175μg, 200μg, 250μg τρικαπριλίνης, η οποία λειτουργεί ως πρότυπο. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το διχρωμικό άλας.

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προκύπτει υπολογίζονται οι ποσότητες των απομονωθέντων λιπιδίων. Η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

2.5 Ποιοτικός προσδιορισμός μέσω Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης φάσης (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)

Το λιπιδιακό συστατικό που απομονώθηκε από το φυτό και που εμφανίζει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση αναλύεται περαιτέρω μέσω Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC). Η RP-HPLC είναι μία μέθοδος κατά την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος, καθώς επίσης είναι εφικτή η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των συστατικών αυτών. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται μία μη πολική στατική φάση, το δεκαοκτυλ-σιλάνιο (C18), το οποίο είναι προσροφημένο στην επιφάνεια λεπτών

κόκκων πυριτίου. Η φάση αυτή περιέχεται σε χρωματογραφική στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα (στήλη C18). Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται το μίγμα χλωροφορμίου- ισοπροπανόλης σε αναλογία 3:1, το οποίο είναι περισσότερο πολικό από τη στατική φάση και για αυτό το λόγω η μέθοδος ονομάζεται ανάστροφης φάσης. Μετά την έγχυση του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη, τα συστατικά του μίγματος που αναλύεται μετακινούνται προς την έξοδο παρασυρόμενα από την κινητή φάση. Τα συστατικά εκείνα που έχουν υψηλή χημική συγγένεια με τη στατική φάση, συγκρατούνται από αυτήν και μετακινούνται με μικρή ταχύτητα, ενώ εκείνα που έχουν χαμηλή συγγένεια με τη στατική φάση, δεν συγκρατούνται ισχυρά και μετακινούνται με μεγαλύτερες ταχύτητες. Μέσω κατάλληλων ανιχνευτών, τα δεδομένα αυτά μεταφέρονται στο σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα της HPLC και λαμβάνεται το χρωματογράφημα (Kucharska et al., 2010). Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Διαφορετικές ποσότητες του λιπιδιακού συστατικού που απομονώθηκε από την TLC, εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου και έπειτα επαναιωρούνται σε 1ml χλωροφορμίου – ισοπροπανόλης 3:1.
- Τα διαλύματα που προκύπτουν έχουν συγκέντρωση 0,25mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml και 22mg/ml. Στη συνέχεια τα διαλύματα διηθούνται με φίλτρο των 0,45μm για τον πλήρη καθαρισμό τους από τυχόν υπάρχοντα σωματίδια.
- Το μίγμα χλωροφορμίου – ισοπροπανόλης (3:1) το οποίο χρησιμοποιείται ως κινητή φάση επίσης διηθείται υπό κενό από ηθμό πορώδους πορσελάνης των 0,45μm για την απομάκρυνση των πιθανών σωματιδίων που βρίσκονται εντός του.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε χρωματογραφικό σύστημα αποτελούμενο από υγρό χρωματογράφο Agilent 1200 series εξοπλισμένο με βρόχο έγχυσης δείγματος των 20μl. Το μήκος κύματος ορίζεται στα 254nm, 280nm και 350nm, ο χρόνος ροής ρυθμίζεται στο 1ml/min και η διάρκεια της ανάλυσης ορίζεται στη μία ώρα. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με χρωματογραφική στήλη Alltech C18, με μέγεθος σωματιδίων 10μm (250mm x 4,6mm I.D.). Οι κορυφές που αντιπροσωπεύουν την προς ανάλυση ουσία αναγνωρίζονται από το χρόνο κατακράτησης τους, όπως επίσης και από το μοτίβο του φάσματος τους, το οποίο καταγράφεται με ανιχνευτή συστοιχίας διοδίων μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Agilent ChemStation chromatography software.

Όταν εμφανίζεται κάποια κορυφή, τότε το κλάσμα της συλλέγεται σε γυάλινο σωληνάριο και φυλάσσεται στους -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την σκλαρεόλη, η οποία χρησιμοποιείται ως πρότυπο.

2.6 Φασματοσκοπία μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS)

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού, χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS).

Κατά την εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο, το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας με κατάλληλη ταχύτητα ($\mu\text{l}/\text{min}$). Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει την βελόνα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται σταγονίδια με ηλεκτρικά φορτία στην επιφάνειά τους. Οι φορτισμένες μικρές σταγόνες που παράγονται διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και τα μόρια του αναλυτή φορτίζονται. Η διάμετρος της σταγόνας συνεχώς μειώνεται λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη και η πυκνότητα του φορτίου αυξάνεται. Όταν η δύναμη απώθησης Coulomb ισούται με εκείνη της επιφανειακής τάσης της σταγόνας (όριο Rayleigh), η σταγόνα υφίσταται σχάση και δημιουργούνται πολλά μικρότερα και περισσότερο φορτισμένα σταγονίδια, των οποίων η διάμετρος συνεχώς μειώνεται λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη και των σχάσεων που υφίστανται. Όταν η πυκνότητα του φορτίου των σταγονιδίων φτάσει περίπου τα $10^8 \text{ V}/\text{cm}^3$, πραγματοποιείται η εξάτμιση (εκρόφηση) των ιόντων στην αέρια φάση, όπου μέσω ενός αναλυτή μάζας με ισχυρό μαγνητικό πεδίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός τους. Τα ουδέτερα φορτισμένα ιόντα δεν επηρεάζονται από το μαγνητικό πεδίο και χάνονται, ενώ τα θετικά φορτισμένα ιόντα επηρεάζονται από το ισχυρό μαγνητικό πεδίο και ανάλογα με το λόγο μάζας/φορτίο (m/z) εκτρέπονται και ταξινομούνται μέσω κατάλληλου ανιχνευτή, ο οποίος τα καταγράφει ως κορυφές στις διάφορες τιμές μάζας/φορτίου. Από το φάσμα μαζών που προκύπτει, είναι εφικτός ο προσδιορισμός ενός άγνωστου μορίου (Fenn et al., 1989, Iribarne et al., 1976)

- Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού, χρησιμοποιούνται τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την RP-HPLC και τα οποία αντιστοιχούν στις κορυφές που εμφανίστηκαν.
- Σε κάθε δείγμα προστίθεται 0,1% φορμικό οξύ για την διευκόλυνση του ιονισμού της ουσίας και έπειτα πραγματοποιείται μέτρηση.
- Ως τυφλό χρησιμοποιείται το μίγμα των διαλυτών χλωροφόρμιο: ισοπροπανόλη 3:1.
- Ως πρότυπο χρησιμοποιείται η σκλαρεόλη.

Η ανάλυση των δειγμάτων με απευθείας έγχυση με την τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας πραγματοποιείται με το σύστημα Agilent 1100 Technologies LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), αποτελούμενο από αντλία Agilent G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1313A, απαερωτή Agilent G1379A και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B. Το φασματόμετρο μαζών είναι τύπου Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer) εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003. Αέριο άζωτο N_2 χρησιμοποιείται ως εκνεφωτής σε πίεση 10 psi και η ροή ρυθμίζεται στα 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Η θερμοκρασία και το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίζονται στους 325°C και 3.5 kV, αντίστοιχα. Η λήψη του φάσματος μάζας MS πραγματοποιείται σε ένα εύρος τιμών 50 έως 800 m/z.

2.7 *In vitro* πειράματα

2.7.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι:

Λειομυοσαρκωματικά κύτταρα επίμυος Wistar, LMS

Κύτταρα αδενοκαρκινώματος μαστού, MCF -7

Κύτταρα καρκινώματος τραχήλου, HeLa

Κύτταρα οστεοσαρκώματος, U2OS

Κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα, MRC-5

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία των 90mm, σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη και 1,4mM L-γλουταμίνη και διατηρούνταν σε επωαστή στους 37°C, με 5% CO₂. Η μεταχείριση τους πραγματοποιούνταν σε εστία κυτταροκαλλιέργειας κάθετης νηματικής ροής (Tissue culture hood).

2.7.1.1 Διατήρηση των κυττάρων

Για τη διατήρηση των κυττάρων πραγματοποιείται φύλαξή τους σε βαθιά κατάψυξη, σε υγρό άζωτο, στους -180° C. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό DMEM από το τρυβλίο.
- Προστίθενται 10ml PBS για την πλύση των κυττάρων το οποίο επίσης απομακρύνεται.
- Κατόπιν προστίθεται 1 ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή (37°C, 5% CO₂) για 3 λεπτά για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα του τρυβλίου.
- Η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 10ml PBS.
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 3000 στροφές.

- Έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα και προστίθενται στο κυτταρικό ίζημα 1ml DMSO και 9ml FBS, τα οποία αποτελούν το διάλυμα συντήρησης των κυττάρων.
- Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικές αμπούλες (cryotubes) του 1ml, τα οποία αντέχουν σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και τα κύτταρα τοποθετούνται σε κατάψυξη, στους -80°C για 24 ώρες.
- Έπειτα μεταφέρονται σε φιάλη υγρού αζώτου, σε θερμοκρασία -180°C . Η διαδοχική αυτή ψύξη προφυλάσσει τα κύτταρα και αποτρέπει τις μηχανικές βλάβες των κυτταρικών μεμβρανών τους.
- Για την απόψυξη των κυττάρων, οι αμπούλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας 37°C , για 1-2 λεπτά και έπειτα το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο.

2.7.1.2 Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Όταν τα κύτταρα σχηματίσουν πλήρεις καλλιέργειες πραγματοποιείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας κατά την οποία:

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό DMEM από το τρυβλίο.
- Προστίθενται 10ml PBS για την πλύση των κυττάρων το οποίο επίσης απομακρύνεται.
- Κατόπιν προστίθεται 1 ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή (37°C , 5% CO_2) για 3 λεπτά για να δράσει η θρυψίνη και να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τρυβλίου.
- Η αποκόλληση υποβοηθείται μηχανικά και η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 10ml DMEM.
- Το κυτταρικό εναιώρημα που προκύπτει αναδεύεται καλά για τη διάσπαση των τυχόν συσσωματωμάτων των κυττάρων.
- Έπειτα προστίθεται κατάλληλος όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος στο τρυβλίο και κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10ml.

2.7.1.3 Σπορά των κυττάρων

Η σπορά είναι μία διαδικασία κατά την οποία προστίθεται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων σε τρυβλία ή πολυτρυβλία. Κατά τη διαδικασία αυτή:

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό DMEM από το αρχικό τρυβλίο των 90mm και προστίθενται 10ml PBS για την πλύση των κυττάρων.
- Έπειτα προστίθεται 1 ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή (37°C, 5% CO₂) για 3 λεπτά για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα του τρυβλίου.
- Κατόπιν προστίθενται 10ml DMEM.
- Ακολουθεί ανάδευση του κυτταρικού εναιωρήματος και μεταφορά αυτού σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon.
- Ποσότητα των 11μl του κυτταρικού εναιωρήματος τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer για την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που υπήρχαν αρχικά στο τρυβλίο.
- Υπολογίζεται ο συγκεκριμένος αριθμός των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθεί και κατάλληλος όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος προστίθεται στα τρυβλία/πολυτρυβλία.
- Έπειτα προστίθεται ποσότητα DMEM για την πλήρωση του κατάλληλου όγκου στα τρυβλία/πολυτρυβλία και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή (37°C, 5% CO₂) για να αναπτυχθούν.

2.7.2 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο του MTT

Με τη μέθοδο του MTT μελετάται η κυτταροτοξική δράση των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου [MTT, ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται κρύσταλλοι φορμαζάνης πορφυρού χρώματος, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικός ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι ανάλογη του

αριθμού των ζώντων κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη DMSO και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά (Mosmann, 1983). Η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης με τη μέθοδο του MTT έχει ως εξής:

- Πραγματοποιείται σπορά των κυττάρων LMS, MCF-7, HeLa, U2OS και MRC-5 σε πολυτρυβλία των 96 φρεατίων (96x).
- Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 5.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 0,1ml.
- Μετά την πάροδο 24 ωρών προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του διαλύτη.
- Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DMEM για πλήρωση του όγκου στα 0,2ml.
- Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιούνται τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό DMEM.
- Μετά από 24, 48 και 72 ώρες (ανάλογα τον πειραματικό σχεδιασμό) σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 50 μ l MTT. Το MTT παρασκευάζεται με διάλυση 0,2 g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide σε 100 ml PBS.
- Τα πολυτρυβλία παραμένουν για 3 ώρες στον επωαστή (37°C, 5% CO₂).
- Κατόπιν απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα προσεκτικά.
- Προστίθενται 0,2ml DMSO σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί καλή ανάδευση για την ομογενοποίηση του διαλύματος DMSO με το κυτταρικό ίζημα.
- Έπειτα τα πολυτρυβλία φωτομετρούνται σε φασματοφωτόμετρο (Multiscan Spectrum, Thermo Scientific) σε μήκος κύματος 570nm, ενώ το μήκος κύματος του φίλτρου αναφοράς είναι τα 690nm.

Όλες οι πειραματικές διεργασίες επαναλαμβάνονται εις τριπλούν. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

2.7.3 Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο Trypan blue

Η μέθοδος Trypan blue αποτελεί επίσης μία μέθοδο μελέτης της κυτταροτοξικής δράσης των ουσιών και βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής Trypan blue να εισέρχεται στα νεκρά κύτταρα και να τα χρωματίζει μπλε, ενώ δεν έχει την ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες των ζώντων κυττάρων. Η παρασκευή του διαλύματος Trypan blue 0,4% γίνεται με την προσθήκη 0,4mg

χρωστικής σε 100ml διαλύματος PBS. Για τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης ουσιών με τη μέθοδο αυτή ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Πραγματοποιείται σπορά κυττάρων LMS, MCF-7 και MRC-5 σε πολυτρυβλία των 24 φρεατίων (24x).
- Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 20.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 1ml.
- Μετά την πάροδο 24 ωρών αφαιρείται το καλλιεργητικό μέσο (DMEM).
- Πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με 1ml PBS.
- Έπειτα προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του διαλύτη (DMSO).
- Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται κατάλληλη ποσότητα DMEM για πλήρωση του όγκου στο 1ml.
- Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιούνται τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό DMEM.
- Έπειτα από 48 ή/και 72 ώρες (ανάλογα τον πειραματικό σχεδιασμό) απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό DMEM από κάθε φρεάτιο και προστίθεται 1ml PBS για την πλύση των κυττάρων το οποίο επίσης απομακρύνεται.
- Κατόπιν προστίθενται 0,25 ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή (37°C, 5% CO₂) για 4 λεπτά για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα του πολυτρυβλίου.
- Η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 0,25ml PBS.
- Έπειτα προστίθενται 0,5ml χρωστικής Trypan blue (0,4%) και τα κύτταρα επώάζονται για 5 λεπτά.
- Κατά τη διάρκεια επώασης, πραγματοποιείται συνεχή και ήπια ανάδευση των κυττάρων για την επαναιώρηση τους.
- Από κάθε κυτταρικό εναιώρημα ποσότητα των 11μl τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer για την μέτρηση του αριθμού των ζώντων κυττάρων.
- Έπειτα υπολογίζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό ο αριθμός των κυττάρων που εκτέθηκαν στην ουσία και τον διαλύτη (DMSO) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Όλες οι πειραματικές διεργασίες επαναλαμβάνονται εις τριπλούν.

2.7.4 Έλεγχος ικανότητας ανάπτυξης αποικιών

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων που δεν οδηγήθηκαν σε θάνατο, έπειτα από επώαση τους με έναν κυτταροτοξικό παράγοντα, ελέγχεται με τη μέθοδο της ικανότητας ανάπτυξης αποικιών. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Πραγματοποιείται σπορά LMS και MCF-7 κυττάρων σε πολυτρυβλία 24x.
- Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 20.000 κύτταρα σε τελικό όγκο 1ml.
- Μετά την πάροδο 24 ωρών προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του διαλύτη (DMSO).
- Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιούνται τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό DMEM.
- Έπειτα από 48 ώρες απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό DMEM από κάθε φρεάτιο και προστίθεται 1ml PBS για την πλύση των κυττάρων το οποίο επίσης απομακρύνεται.
- Κατόπιν προστίθενται 0,25 ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή για 4 λεπτά για την αποκόλληση τους.
- Η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 0,75ml θρεπτικού υλικού DMEM και πραγματοποιείται συνεχής και ήπια ανάδευση για την επαναιώρηση των κυττάρων.
- Από κάθε κυτταρικό εναιώρημα λαμβάνεται ποσότητα των 11μl και τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer για την μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων κάθε φρεατίου.
- Υπολογίζεται η ποσότητα εναιωρήματος που πρέπει να ληφθεί από κάθε φρεάτιο για την σπορά 600 κυττάρων σε πολυτρυβλία των 6 φρεατίων (6x) και έπειτα συμπληρώνεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού ούτως ώστε ο τελικός όγκος να είναι 3ml.
- Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή και ανά δύο μέρες πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού.
- Την έβδομη ημέρα επώασης πραγματοποιείται η διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων η οποία έχει ως εξής:
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό.
- Προστίθενται 3ml PBS για την πλύση των κυττάρων τα οποία επίσης απομακρύνονται.

- Κατόπιν προστίθενται 3ml μίγματος μεθανόλης/οξικού οξέος αναλογίας 3:1.
- Τα πολυτρυβλία τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C για 10 λεπτά για την μονιμοποίηση των κυττάρων.
- Έπειτα αφαιρείται το μίγμα των διαλυτών και τα πολυτρυβλία τοποθετούνται σε επαγωγό, σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου στεγνώσουν πλήρως.
- Κατόπιν προστίθενται 3ml χρωστικής Giemsa/ H_2O αναλογίας 1:10 σε κάθε φρεάτιο, για 25-30 λεπτά, για την χρώση των κυττάρων.
- Ακολουθεί απομάκρυνση της χρωστικής και ήπια πλύση των πολυτρυβλίων με νερό βρύσης.
- Έπειτα τα πολυτρυβλία τοποθετούνται σε προσροφητικό χαρτί και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Πραγματοποιείται μέτρηση των βαμμένων αποικιών και υπολογίζεται ο αριθμός των αποικιών που σχηματίστηκαν έπειτα από την έκθεση των κυττάρων στην ουσία και στον διαλύτη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου σε ποσοστό επί τοις εκατό.

Όλες οι πειραματικές διεργασίες επαναλαμβάνονται εις τριπλούν.

2.7.5 Έλεγχος μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μέσω της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι εφικτός ο προσδιορισμός του μηχανισμού θανάτου που επέρχεται στα καρκινικά κύτταρα έπειτα από την επίδραση της ουσίας που μελετάται. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα του αρνητικά φορτισμένου DNA να μετακινείται προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, έπειτα από εφαρμογή συγκεκριμένης τάσης και ο εντοπισμός του είναι εφικτός έπειτα από χρώση του με φθορίζον χρωστική η οποία ανιχνεύεται με λάμπα υπεριώδους φωτός. Οι ζώνες που εμφανίζονται στο πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικού μεγέθους θραύσματα του DNA, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι ο κυτταρικός θάνατος προήλθε μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης ενώ ο μηχανισμός νέκρωσης δεν προκαλεί κατακερμάτιση του DNA και συνεπώς δεν εμφανίζονται ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης.

2.7.5.1 Απομόνωση DNA

- Πραγματοποιείται σπορά των κυτταρικών σειρών LMS, MCF-7 και MRC-5 σε τρυβλία 90mm.
- Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 160.000 κύτταρα.
- Μετά την πάροδο 48 ωρών προστίθενται σε αυτά διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται.
- Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιούνται τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό DMEM.
- Έπειτα από 48 ώρες, πραγματοποιείται η διαδικασία απομόνωσης του DNA.
- Το θρεπτικό υλικό κάθε τρυβλίου μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 15ml.
- Ακολουθεί πλύση των κυττάρων κάθε τρυβλίου με 5ml PBS εις διπλούν και μεταφορά του στο αντίστοιχο falcon.
- Στα τρυβλία όπου έχουν παραμείνει προσκολλημένα τα κύτταρα προστίθενται 2ml PBS για την προστασία τους.
- Τα falcon που περιέχουν τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρούνται στις 2.000 στροφές για 5 λεπτά, σε ψυκτικό θάλαμο, στους 4° C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το προκύπτον υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Ακολουθεί προσεκτική αποκόλληση των κυττάρων από τα τρυβλία με σιλικόνη και μεταφορά αυτών στα αντίστοιχα falcon.
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρωση των falcon στις 2.000 στροφές, για 5 λεπτά, σε ψυκτικό θάλαμο, στους 4°C.
- Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml PBS σε κάθε κυτταρικό ίζημα και ήπια ανάδευση για την ομοιόμορφη επαναιώρηση των κυττάρων.
- Εν συνεχεία κάθε κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε erpendorf.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση των erpendorf στις 6.000 στροφές, για 2-5 λεπτά, σε ψυκτικό θάλαμο στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Προστίθενται 100μl DNA Lysis Buffer σε κάθε κυτταρικό ίζημα για την λύση των κυττάρων. Η λύση και ομογενοποίηση των κυττάρων υποβοηθείται μηχανικά μέσω ήπιας ανάδευσης με το δάχτυλο (tapping).
- Κατόπιν τα erpendorf επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο.

- Έπειτα τα eppendorf φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές, για 30 λεπτά στον ψυκτικό θάλαμο (4°C).
- Ακολουθεί μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται 2μl RNase A για τη διάσπαση του RNA.
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 ώρες.
- Έπειτα προστίθενται 2,5 μl Proteinase K για την απενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών ενζύμων καθώς και την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA και συνεχίζεται η επώαση στους 37°C για δύο ώρες επιπλέον.
- Μετά το πέρας των δύο ωρών προστίθενται 20μl NaCl 5M και 120μl Isopropanol για τη διευκόλυνση της καταβύθισης των μορίων του DNA και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C για όλο το βράδυ (overnight).
- Την επόμενη μέρα τα δείγματα αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά, στον ψυκτικό θάλαμο (4°C).
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα eppendorf τοποθετούνται ανάποδα σε απορροφητικό χαρτί έως ότου στεγνώσουν πλήρως.
- Κατόπιν προστίθενται 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1xTE pH 7,4, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 5ml 1M Tris-Cl pH 7,4 (όπου το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος), 1ml 0,5M EDTA pH8 (ρύθμιση του pH με την προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου) και δισαπεσταγμένο νερό έως ότου ο όγκος πληρωθεί στα 500ml.
- Ακολουθεί μηχανική ανάδευση των δειγμάτων με το δάχτυλο (tapping) και τοποθέτηση τους στο υδατόλουτρο στους 37°C για τρεις ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα αναδεύονται μηχανικά κάθε 20 λεπτά.

2.7.5.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης:

- 0,91gr αγαρόζης διαλύονται σε 70ml διαλύματος TBE (1,3%). Για τη παρασκευή του διαλύματος αυτού, αρχικά διαλύονται 54gr Tris και 27,5gr βορικού οξέος σε 400ml δισαπεσταγμένου νερού. Κατόπιν προστίθενται 20ml 0,5M EDTA pH 8 και ο όγκος πληρώνεται στα 500ml με δισαπεσταγμένο νερό (διάλυμα TBE 10x).

Από το διάλυμα αυτό λαμβάνονται 7ml, προστίθενται 63ml δισαπεσταγμένο νερό και προκύπτει το διάλυμα TBE 1,3%.

- Έπειτα το μίγμα ζεσταίνεται για 1 λεπτό περίπου σε φούρνο μικροκυμάτων έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως η αгарόζη.
- Στη συνέχεια, προστίθενται 2,7 ml βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων και με αυτό τον τρόπο να δεσμεύεται στο DNA. Λόγω της ικανότητας του να διεγείρεται με την υπεριώδη ακτινοβολία και να φθορίζει στο ορατό φάσμα είναι δυνατή η οπτικοποίηση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα της αгарόζης έπειτα από έκθεση του στην υπεριώδη ακτινοβολία.
- Κατόπιν το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική φόρμα με χτενάκι ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια και αφήνεται να κρυώσει και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.

Ηλεκτροφόρηση DNA

- Στα δείγματα που περιέχουν το απομονωμένο DNA προστίθενται 2μl DNA loading buffer.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για τη καθίζηση των δειγμάτων και την εύκολη συλλογή τους.
- Το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προστίθενται 430ml διαλύματος TBE 10x, το οποίο αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα που βοηθά στην διατήρηση της σταθερότητας του pH, παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και κατά συνέπεια την εύκολη μετακίνηση του DNA.
- Έπειτα απομακρύνεται το χτενάκι από το πήκτωμα αгарόζης.
- Σε κάθε πηγαδάκι που έχει σχηματιστεί προστίθενται 20μl δείγματος.
- Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 40V για 10 λεπτά και στα 60V για 90 λεπτά.
- Όταν η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί, το πήκτωμα αгарόζης μεταφέρεται σε ειδική συσκευή UV, όπου φωτογραφίζεται.

Όλη η πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

2.7.6 Έλεγχος μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω κυτταρομετρίας ροής

Το είδος του κυτταρικού θανάτου που επέρχεται στα καρκινικά κύτταρα έπειτα από την επίδραση της ουσίας που μελετάται μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η μέτρηση και η ανάλυση διάφορων φυσικών και χημικών παραμέτρων μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν διαμέσου μίας συσκευής οπτικής ή/και ηλεκτρονικής ανίχνευσης.

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, η κυτταροπλασματική μεμβράνη χάνει τη συμμετρία της, η φωσφατιδυλοσερίνη, ένα μεμβρανικό φωσφολιπίδιο, μετακινείται από την εσωτερική της πλευρά στην εξωτερική της και εκτίθεται προς το εξωκυττάριο περιβάλλον. Μέσω της κυτταρομετρίας ροής το συμβάν αυτό μπορεί να μετρηθεί, χρησιμοποιώντας την επωαζόμενη με τον φθορίζοντα παράγοντα FITC πρωτεΐνη Αννεξίνη V, η οποία φέρει υψηλή συγγένεια με την φωσφατιδυλοσερίνη και προσδένεται σε αυτήν με τρόπο εξαρτώμενο από το ασβέστιο. Λόγω του ότι η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι ένα γεγονός που συμβαίνει και στον μηχανισμό νέκρωσης, για τον διαχωρισμό των δύο μηχανισμών θανάτου, απόπτωσης και νέκρωσης, χρησιμοποιείται και η φθορίζουσα χρωστική Propidium Iodide (PI). Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου όταν η διαπερατότητα τους είναι χαμηλή, γεγονός που συμβαίνει όταν τα κύτταρα έχουν πεθάνει ή έχουν καταστραφεί. Επιπλέον, παρεμβάλλεται εντός των νουκλεϊκών οξέων και εμφανίζει ερυθρό φθορισμό. Κύτταρα με άθικτες τις κυτταροπλασματικές τους μεμβράνες, τα οποία είναι ζωντανά, είτε πρόμα αποπτωτικά δεν χρωματίζονται με αυτή τη χρωστική. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δύο μηχανισμών θανάτου (Wlodkowic et al., 2012).

Η διαδικασία της κυτταρομετρίας ροής έχει ως εξής:

- Πραγματοποιείται σπορά 60.000 καρκινικών κυττάρων MCF-7 σε πολυτρυβλία 6x.
- Έπειτα από 24 ώρες προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται.
- Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιούνται τα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό DMEM.
- Μετά την πάροδο 48 ωρών, το θρεπτικό υλικό κάθε φρεατίου μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 15ml.

- Πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων με 2ml PBS και μεταφορά αυτού σε κάθε falcon.
- Έπειτα προστίθενται 0,25ml θρυψίνης και μεταφορά των πολυτρυβλίων στον επωαστή για 4 λεπτά για την αποκόλληση των κυττάρων.
- Η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 0,75ml θρεπτικού υλικού DMEM.
- Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση για την επαναιώρηση των κυττάρων και κατόπιν τα κυτταρικά εναιωρήματα προστίθενται στα αντίστοιχα falcon.
- Από κάθε κυτταρικό εναιώρημα λαμβάνεται ποσότητα των 11μl και τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer για την μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων κάθε φρεατίου.
- Υπολογίζεται η ποσότητα εναιωρήματος που περιέχει 120.000 κύτταρα και μεταφέρεται σε νέο falcon των 15ml.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται σε 1ml PBS και μεταφέρονται σε erpendorf.
- Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται στις 3000 στροφές για 5 λεπτά εις διπλούν.
- Μετά το πέρας της δεύτερης φυγοκέντρησης και την απομάκρυνση του υπερκειμένου, προστίθενται 0,1ml calcium buffer 1x σε κάθε erpendorf και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση. Το calcium buffer δημιουργείται με την προσθήκη 2,6g HEPES, 8,18g NaCl και 0,28g CaCl₂ σε 50ml δισαπεσταγμένο νερό (20x).
- Έπειτα προστίθενται 5μl Αννεξίνη V-FITC και 5μl PI σε κάθε κυτταρικό εναιώρημα και τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κατόπιν, σε κάθε δείγμα προστίθεται 1ml Calcium buffer 1x και πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων σε κυτταρόμετρο ροής (Partec ML, Partec GmbH, Germany).

Το επί τοις εκατό ποσοστό των νεκρωτικών και των αποπτωτικών κυττάρων υπολογίζεται με βάση το σύνολο των ζώντων κυττάρων (100%). Η παραπάνω πειραματική διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν.

2.8 *Ex vivo* πειράματα

2.8.1 Έλεγχος της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια έχουν ποικίλους βασικούς λειτουργικούς ρόλους στη φυσιολογική διαδικασία της αιμόστασης. Η διαδικασία της πήξης του αίματος φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην διαδικασία της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων από την έδρα του πρωτοπαθούς όγκου προς άλλες κατευθύνσεις μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Τα καρκινικά κύτταρα, έπειτα από αποσύνδεσή τους από την αρχική τους θέση, διηθούν τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και μέσω των αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων μεταναστεύουν σε άλλα σημεία του σώματος, όπου δημιουργούν μεταστάσεις. Η διέλευση τους στην κυκλοφορία του αίματος, η αποφυγή των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού και η προσκόλληση τους στο αγγειακό ενδοθήλιο διευκολύνεται μέσω των αιμοπεταλιακών σχηματισμών.

Η μέθοδος της συσσωρευομετρίας επιτρέπει τη μελέτη των αιμοπεταλιακών αντιδράσεων συσσώρευσης *ex vivo*. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω ενός κατάλληλου διεγέρτη και ανίχνευση των αιμοπεταλιακών συσσωματωμάτων μέσω ενός ηλεκτρονικού συσσωρευόμετρου με χαρακτηριστικά οπτικού φασματοφωτόμετρου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το σύστημα C-A 500, της εταιρίας Chronolog.

2.8.1.1 Απομόνωση αιμοπεταλίων

- Πραγματοποιείται λήψη αίματος με αποστειρωμένη σύριγγα των 10ml από τη μεσοβασίλική φλέβα υγιών εθελοντών.
- Το αίμα μεταφέρεται σε σωληνάκια τα οποία περιέχουν κιτρικό οξύ ως αντιπηκτικό.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρωση τους στις 900 στροφές για 20 λεπτά για τον διαχωρισμό των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων από το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP, Plasma Rich Platelets).
- Το PRP (άνω φάση) μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 15ml και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

- Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση του εναπομείναντος περιεχομένου των σωληναρίων, στις 3100 στροφές για 20 λεπτά, για την εξαγωγή του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος (PPP, Plasma Poor Platelets) (άνω φάση).

2.8.1.2 Έλεγχος συσσώρευσης

- Σε κατάλληλη κυψελίδα προστίθενται 0,45ml PRP μαζί με μαγνήτη ανάδευσης, η οποία κατόπιν τοποθετείται στη σχισμή του συσσωρευομέτρου.
- Η ταχύτητα περιστροφής του μαγνήτη ρυθμίζεται στις 1500 στροφές ώστε το PRP να αναδύεται ισχυρά προσομοιάζοντας τις συνθήκες της στροβιλώδους αιματικής ροής στην οποία η συσσώρευση των αιμοπεταλίων συμβαίνει αυθόρμητα.
- Στη δεύτερη σχισμή του συσσωρευομέτρου τοποθετείται η κυψελίδα που περιέχει το PPP, το οποίο αποτελεί το σημείο αναφοράς.
- Έπειτα από τη ρύθμιση της συσκευής (calibration), πραγματοποιείται η μελέτη της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Μέσω του συνδεδεμένου με το συσσωρευόμετρο συστήματος ηλεκτρονικού υπολογιστή παρακολουθείται το επί τοις εκατό ποσοστό συσσώρευσης.

Έλεγχος διεγερτών

- Αρχικά σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 0,45ml PRP και ο μαγνήτης ανάδευσης.
- Η κυψελίδα τοποθετείται στη σχισμή του συσσωρευομέτρου και μετά την πάροδο 30 δευτερολέπτων προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις των αγωνιστών ADP και PAF για την εύρεση της συγκέντρωσης εκείνης όπου η αιμοπεταλιακή συσσώρευση είναι η μέγιστη.

Έλεγχος διεγερτικής δράσης της ουσίας που μελετάται

- Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 0,45ml PRP, ο μαγνήτης ανάδευσης, καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται.
- Έπειτα η κυψελίδα τοποθετείται στη σχισμή του συσσωρευομέτρου και πραγματοποιείται ο έλεγχος.
- Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του διαλύτη.

Έλεγχος ανασταλτικής δράσης της ουσίας που μελετάται

- Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 0,45ml PRP, ο μαγνήτης ανάδευσης καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας που μελετάται.
- Η κυψελίδα τοποθετείται στη σχισμή του συσσωρευόμετρου και μετά την πάροδο ενός λεπτού προστίθεται ο διεγέρτης στη συγκέντρωση εκείνη όπου πραγματοποιείται η μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
- Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τον διαλύτη της ουσίας.
- Ως σημείο αναφοράς για την ανασταλτική δράση της ουσίας και του διαλύτη χρησιμοποιείται το ποσοστό συσσώρευσης που προκάλεσε ο διεγέρτης μόνος του.

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ποσοστό επί τοις εκατό σε σχέση με το σημείο αναφοράς (100% συσσώρευση). Όλες οι πειραματικές διεργασίες επαναλαμβάνονται εις τριπλούν.

2.9 *In vivo* πειράματα

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιούνται θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3-4 μηνών. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων τα πειραματόζωα τρέφονται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και σε περιβάλλον με περιοδικό φωτισμό.

2.9.1 Οξεία τοξικότητα

Ο έλεγχος της οξείας τοξικότητας πραγματοποιείται για την εύρεση των ποσοτήτων της ουσίας οι οποίες δεν προκαλούν βλάβη ή θάνατο στα πειραματόζωα.

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιούνται 90 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3-4 μηνών και βάρους 200 ± 10 g.

- Οι επίμυες χωρίζονται σε 6 ομάδες των 15 πειραματόζωων.
- Τα πειραματόζωα δεν τρέφονται για 4-5 ώρες πριν την πειραματική διαδικασία.
- Σε κάθε μία από τις 5 ομάδες των πειραματόζωων χορηγείται διαφορετική ποσότητα της ουσίας ενδοπεριτοναϊκά διαλυμένη σε 1ml τρικαπριλίνης.
- Η έκτη ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου, όπου χορηγείται 1ml τρικαπριλίνης.
- Μετά τη χορήγηση της ουσίας τα ζώα αφήνονται ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό.
- Ανά μισή ώρα για διάστημα 12 ωρών πραγματοποιείται έλεγχος της συμπεριφοράς τους και της φυσιολογικής τους κατάστασης.
- Τα πειραματόζωα εκείνα που δεν πεθαίνουν, θυσιάζονται την επόμενη μέρα με ξυλοκαΐνη είτε με αιθέρα.
- Τα εσωτερικά όργανα όλων των πειραματόζωων αφαιρούνται, τοποθετούνται σε αποστειρωμένα δοχεία και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεΐδης 10%.
- Ακολουθεί παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης.

2.9.2 Χρόνια τοξικότητα

Ο έλεγχος της χρόνιας τοξικότητας πραγματοποιείται για την εύρεση τυχόν ανωμαλιών στους ιστούς και τα όργανα των πειραματόζωων έπειτα από μακρόχρονη χορήγηση συγκεκριμένων ποσοτήτων της ουσίας, οι οποίες στην ανωτέρω

πειραματική διαδικασία (οξεία τοξικότητα) φαίνεται πως δεν επηρέασαν τα πειραματόζωα και δεν προκάλεσαν βλάβη ή θάνατο.

Για την πειραματική διαδικασία της χρόνιας τοξικότητας χρησιμοποιούνται 60 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3-4 μηνών και βάρους 200 ± 10 g.

- Οι επίμυες χωρίζονται σε 4 ομάδες των 15 πειραματόζωων.
- Σε κάθε μία από τις τρεις ομάδες των 15 πειραματόζωων χορηγείται διαφορετική ποσότητα της ουσίας ενδοπεριτοναϊκώς διαλυμένη σε 1ml τρικαπριλίνης.
- Η τέταρτη ομάδα των πειραματόζωων αποτελεί την ομάδα ελέγχου, όπου χορηγείται 1ml τρικαπριλίνης.
- Η χορήγηση της ουσίας πραγματοποιείται δύο φορές την εβδομάδα για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων.
- Πριν την πειραματική διαδικασία τα πειραματόζωα δεν τρέφονται για 4-5 ώρες ενώ μετά τη χορήγηση της ουσίας τα ζώα αφήνονται ελεύθερα για να τραφούν σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό.
- Καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας πραγματοποιείται έλεγχος της συμπεριφοράς και της φυσιολογικής κατάστασης των πειραματόζωων ανά τακτά χρονικά διαστήματα ημερησίως.
- Τα πειραματόζωα εκείνα που δεν πεθαίνουν θυσιάζονται τέσσερις ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση της ουσίας με ξυλοκαΐνη.
- Τα εσωτερικά όργανα όλων των πειραματόζωων αφαιρούνται, τοποθετούνται σε αποστειρωμένα δοχεία και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεΐδης 10%.
- Ακολουθεί παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης.

2.9.3 Καρκινογένεση μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar- έλεγχος αντικαρκινικής δράσης

Ο *in vivo* έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης της ουσίας πραγματοποιείται μέσω του ενοφθαλμισμού λειομυοσαρκωματικών κυττάρων LMS σε επίμυες Wistar. Για αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται 45 θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας 3-4 μηνών, βάρους 200 ± 10 g.

Προετοιμασία κυτταρικού υλικού:

- Η απόψυξη και η καλλιέργεια των νεοπλασματικών κυττάρων πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.8.1.1 και 2.8.1.2.
- Όταν τα λειομυοσαρκωματικά κύτταρα LMS έχουν σχηματίσει πλήρεις καλλιέργειες, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό τους, προστίθενται 10ml PBS για την πλύση τους
- Έπειτα προστίθενται 1ml θρυψίνης και τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστή για 3 λεπτά (37°C, 5% CO₂) για την αποκόλληση τους από τον πυθμένα του τρυβλίου.
- Η δράση της θρυψίνης σταματάει με την προσθήκη 10ml θρεπτικού υλικού DMEM.
- Ακολουθεί ανάδευση του κυτταρικού εναιωρήματος και μεταφορά αυτού σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 15ml.
- Ποσότητα των 11μl του κυτταρικού εναιωρήματος τοποθετείται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer για την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που υπάρχουν στο τρυβλίο.
- Έπειτα τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρούνται στις 3000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM στο κυτταρικό ίζημα ούτως ώστε να υπάρχουν 4×10^6 κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού.
- Κατόπιν το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε αποστειρωμένη σύριγγα των 2ml.

Διαδικασία ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar

- Τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνται με 0,5ml διαλύματος κεταμίνης – μιδαζόλης – φυσιολογικού ορού σε αναλογία 1:4:5.
- Μετά την αναισθητοποίηση, οι επίμυες ακινητοποιούνται και πραγματοποιείται μικρή τομή στο κεντρικό τμήμα της ωμικής ζώνης.
- Ο λιπώδης ιστός απομακρύνεται με λαβίδα και έπειτα πραγματοποιείται ελαφρύς τραυματισμός των μυών κάτωθεν της τομής.
- Ακολουθεί έγχυση του εναιωρήματος των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων.

- Κατόπιν η τομή συρράβεται και τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε περιβάλλον με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και περιοδικού φωτισμού.

Τα πειραματόζωα που ανέπτυξαν όγκους εντός 10-15 ημερών, χωρίζονται σε 3 ομάδες. Οι δύο αποτελούν τις ομάδες θεραπείας, στις οποίες χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκώς 2 διαφορετικές ποσότητες της ουσίας διαλυμένης σε 1ml τρικαπριλίνης και η τελευταία ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγείται η τρικαπριλίνη.

- Πρώτη ομάδα: 100mg σκλαρεόλης/ kg βάρους
- Δεύτερη ομάδα: 330mg σκλαρεόλης/ kg βάρους
- Τρίτη ομάδα: ομάδα ελέγχου

Τα ζώα τρέφονται ελεύθερα καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής πορείας κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και με περιοδικό φωτισμό και πραγματοποιείται έλεγχος της συμπεριφοράς και της φυσιολογικής κατάστασης τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα ημερησίως καθώς και έλεγχος του σωματικού βάρους τους κάθε 24 ώρες. Επίσης, ορισμένα ζώα από κάθε ομάδα τοποθετούνται σε μεταβολικούς κλωβούς, στα οποία πραγματοποιείται μέτρηση της κατανάλωσης τροφής και νερού, καθώς και μέτρηση των ούρων και κοπράνων τους κάθε 24 ώρες.

Όταν τα πειραματόζωα πεθαίνουν, αφαιρείται ο όγκος και τα εσωτερικά όργανα τους και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα δοχεία και μονιμοποιούνται με διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%. Ακολουθεί παθολογοανατομικός έλεγχος με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης.

Επίσης υπολογίζεται ο μέσος χρόνος ζωής των πειραματόζωων όλων των ομάδων, η παράταση του χρόνου ζωής τους, T/C% (median survival time of treated rats/median survival time of control %), η επί τοις εκατό αναστολή της αύξησης του βάρους του όγκου, TWI% (tumor weight inhibition %), το μέσο βάρος του όγκου, MTW (median tumor weight) και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου, MTGR (median tumor growth rate), $TGR (g/d) = \text{Βάρος όγκου (g)} / \text{ημέρες επιβίωσης (d)}$.

2.10 Στατιστική ανάλυση

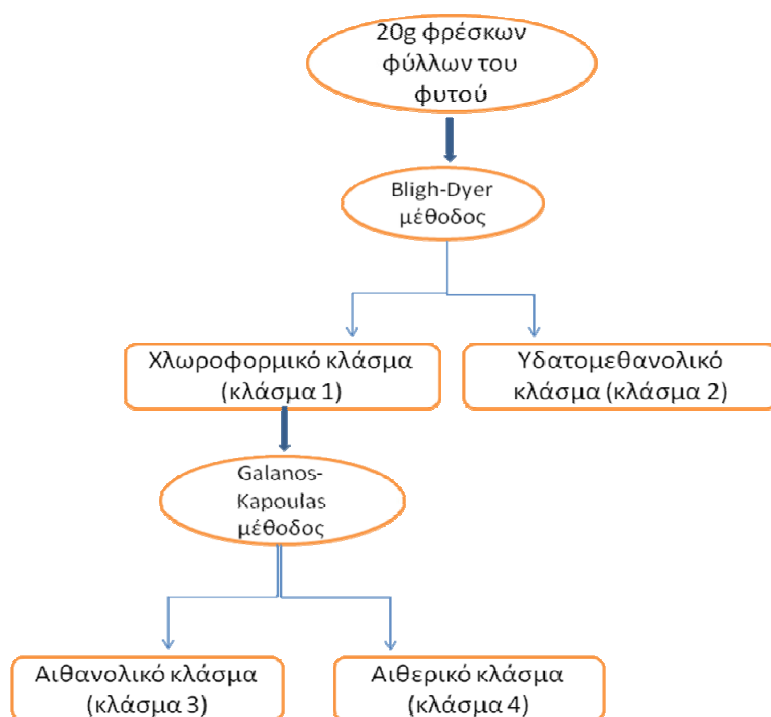
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS statistics 21.0. Όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση. Ο προσδιορισμός της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων κάθε πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιείται με το Student's t-test και την ανάλυση two-way analysis of variance (ANOVA). Οι τιμές με $p < 0.05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα εκχύλισης των λιπιδιακών συστατικών του φυτού 3333

Από την εκχύλιση του φυτού προκύπτουν τέσσερα διαφορετικά λιπιδιακά κλάσματα για κάθε εποχή (Σχήμα 1):

- 1) Το χλωροφορμικό (κλάσμα 1), το οποίο περιέχει όλα τα λιπιδιακά συστατικά του φυτού.
- 2) Το υδατομεθανολικό (κλάσμα 2), το οποίο περιέχει τα περισσότερα πολικά συστατικά του φυτού.
- 3) Το αιθανολικό (κλάσμα 3), το οποίο περιέχει τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα) του φυτού.
- 4) Το αιθερικό (κλάσμα 4), το οποίο περιέχει τα μη πολικά λιπίδια (τερπένια, στερόλες, υδρογονάνθρακες) του φυτού.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων εκχύλισης του φυτού.

3.2 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης των κλασμάτων του φυτού με τη μέθοδο του MTT

Οι συγκεντρώσεις των λιπιδιακών κλασμάτων και των δύο εποχών που μελετήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 1. Πριν από κάθε πειραματική διαδικασία το κάθε κλάσμα εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Το ίζημα που προκύπτει αναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και έπειτα ομογενοποιείται με υπερήχους. Έπειτα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM ώστε οι συγκεντρώσεις των διαλυτών να είναι ως εξής:

Κλάσμα 1: 1% DMSO

Κλάσμα 2: 2% PBS

Κλάσμα 3: 2% Αιθανόλη 60%

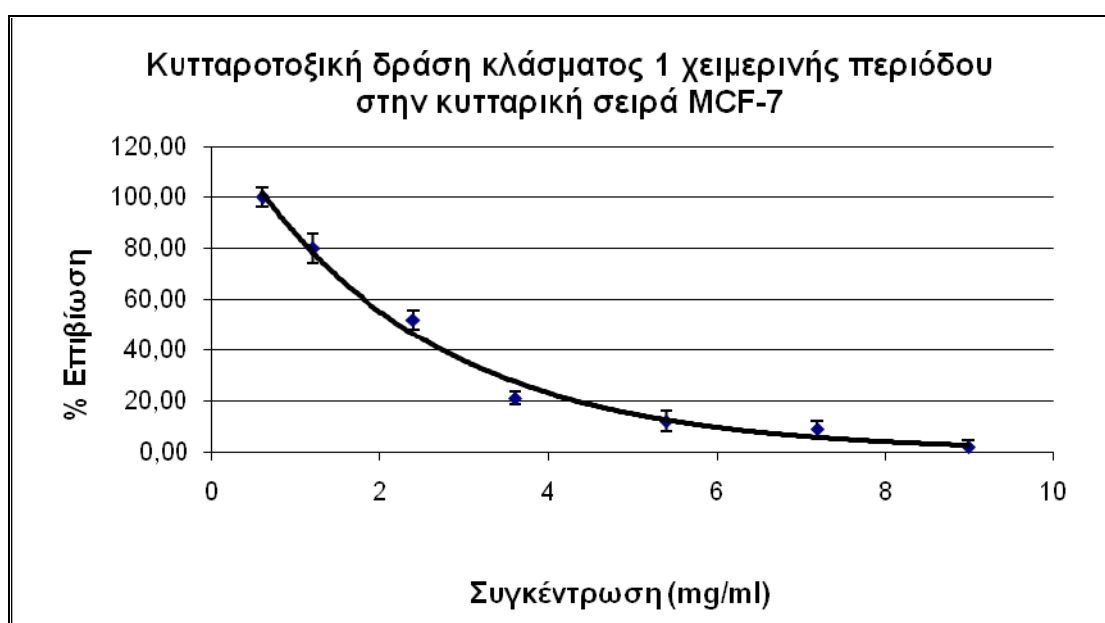
Κλάσμα 4: 1% DMSO

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις των κλασμάτων και των δύο εποχών συγκομιδής που μελετήθηκαν στις κυτταρικές σειρές.

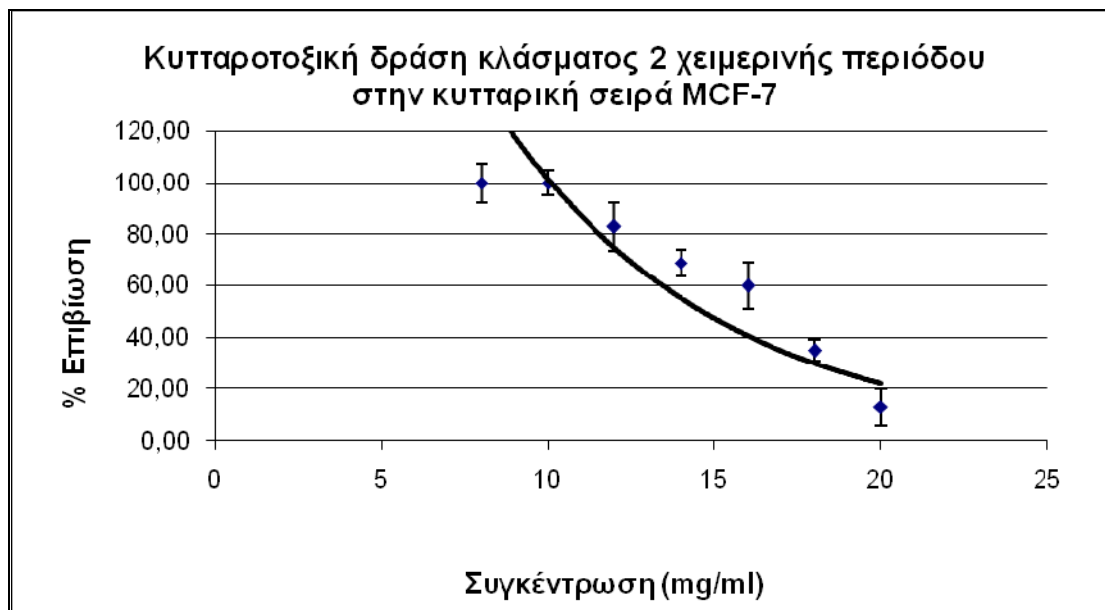
ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΛΑΣΜΑ 1	ΚΛΑΣΜΑ 2	ΚΛΑΣΜΑ 3	ΚΛΑΣΜΑ 4
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ (mg/ml)	0,6	8	0,015	0,015
	1,2	10	0,030	0,030
	2,4	12	0,060	0,060
	3,6	14	0,125	0,125
	5,4	16	0,250	0,250
	7,2	18	0,500	0,500
	9	20	0,750	0,750

Τα τέσσερα κλάσματα του φυτού *Viscum album*, κατά τη χειμερινή εποχή συγκομιδής (Δεκέμβριος-Ιανουάριος), εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7. Το χλωροφορμικό κλάσμα 1, το οποίο περιέχει όλα τα λιπιδιακά συστατικά του φυτού εμφανίζει ισχυρότερη δράση σε

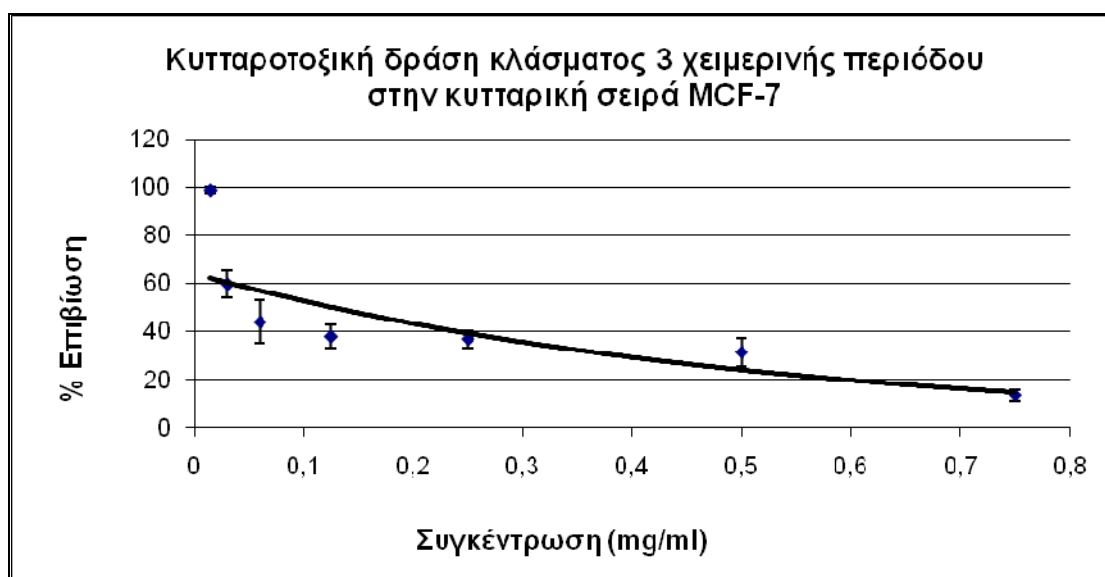
σχέση με το υδατομεθανολικό κλάσμα 2 το οποίο περιέχει τα περισσότερα πολικά συστατικά (Γραφήματα 1 και 2) ($p < 0,05$). Το αιθανολικό κλάσμα 3 και το αιθερικό κλάσμα 4 εμφανίζουν επίσης κυτταροτοξικές ιδιότητες στην καρκινική σειρά του μαστού MCF-7 (Γραφήματα 3 και 4), με το κλάσμα 4 το οποίο περιέχει τα μη πολικά λιπίδια να φέρει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση ($p < 0,05$). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (DMSO, PBS, Αιθανόλη 60%) δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($p > 0,05$).



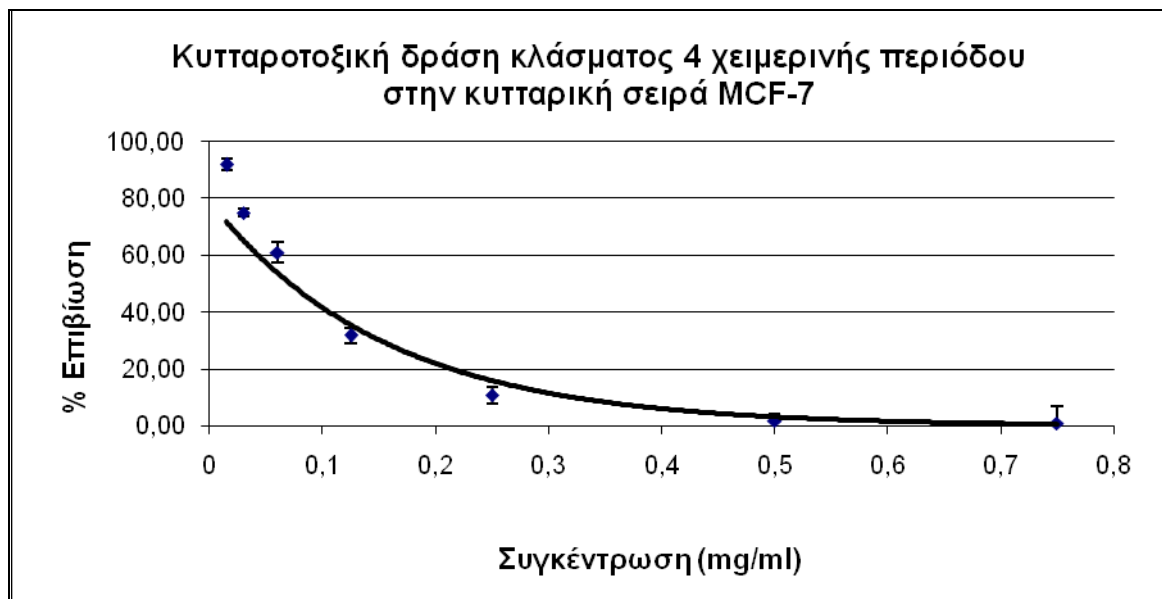
Γράφημα 1. Κυτταροτοξική δράση χλωροφορμικού κλάσματος 1 χειμερινής περιόδου στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $2,3 \pm 0,08 \text{ mg/ml}$.



Γράφημα 2. Κυτταροτοξική δράση υδατομεθανολικού κλάσματος 2 χειμερινής περιόδου στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $16,1 \pm 0,08 \text{ mg/ml}$.

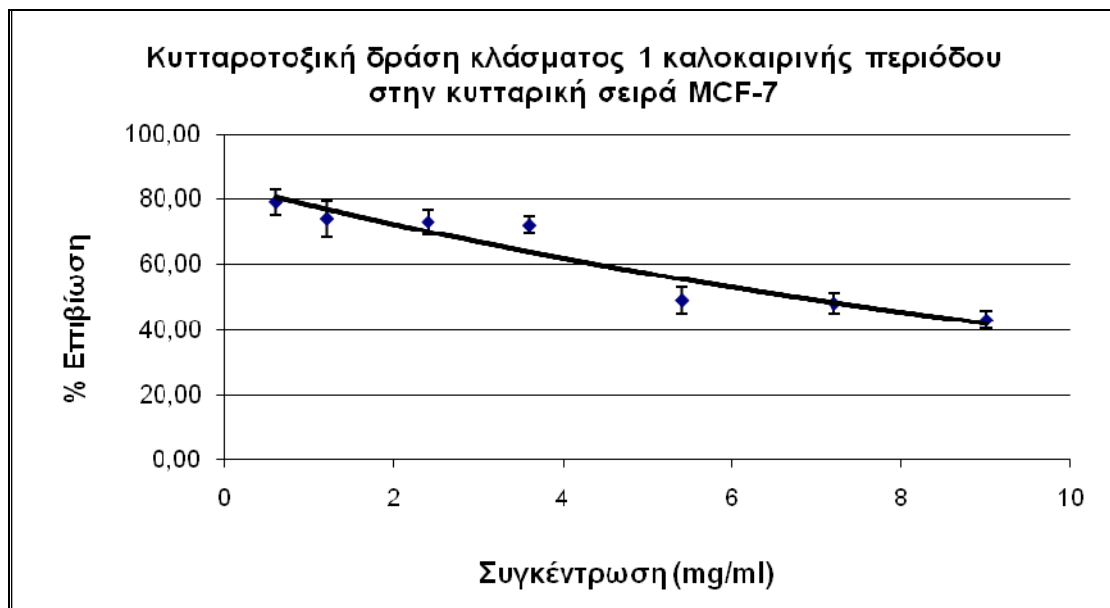


Γράφημα 3. Κυτταροτοξική δράση αιθανολικού κλάσματος 3 χειμερινής περιόδου στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7 και τιμή IC_{50} $0,154 \pm 0,028 \text{ mg/ml}$.

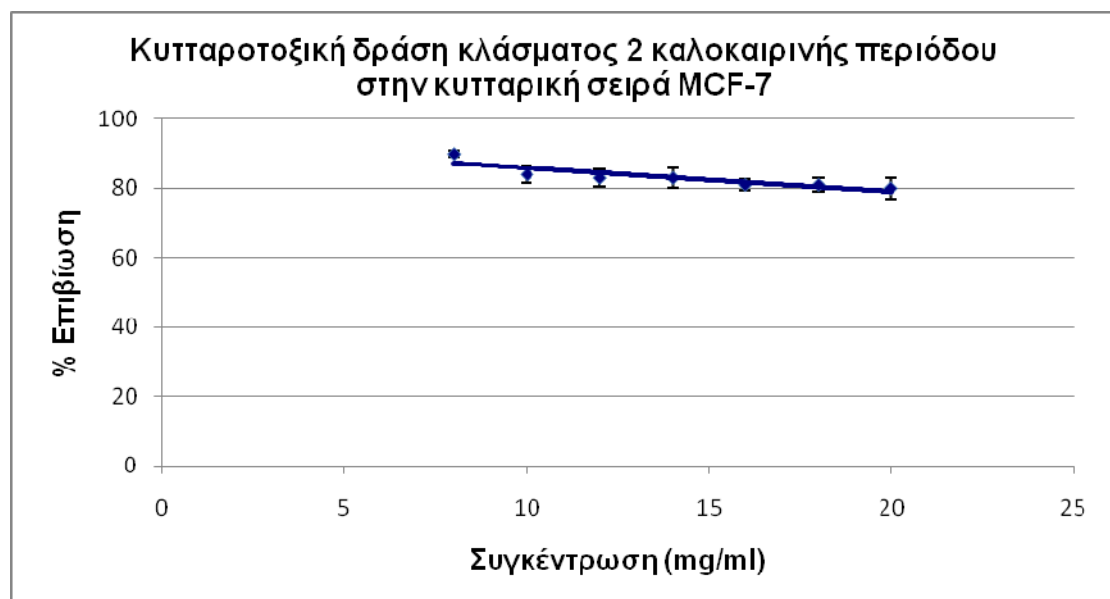


Γράφημα 4. Κυτταροτοξική δράση κλάσματος 4 χειμερινής περιόδου στην καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} του αιθερικού κλάσματος 4 είναι $0,0807 \pm 0,005 \text{ mg/ml}$.

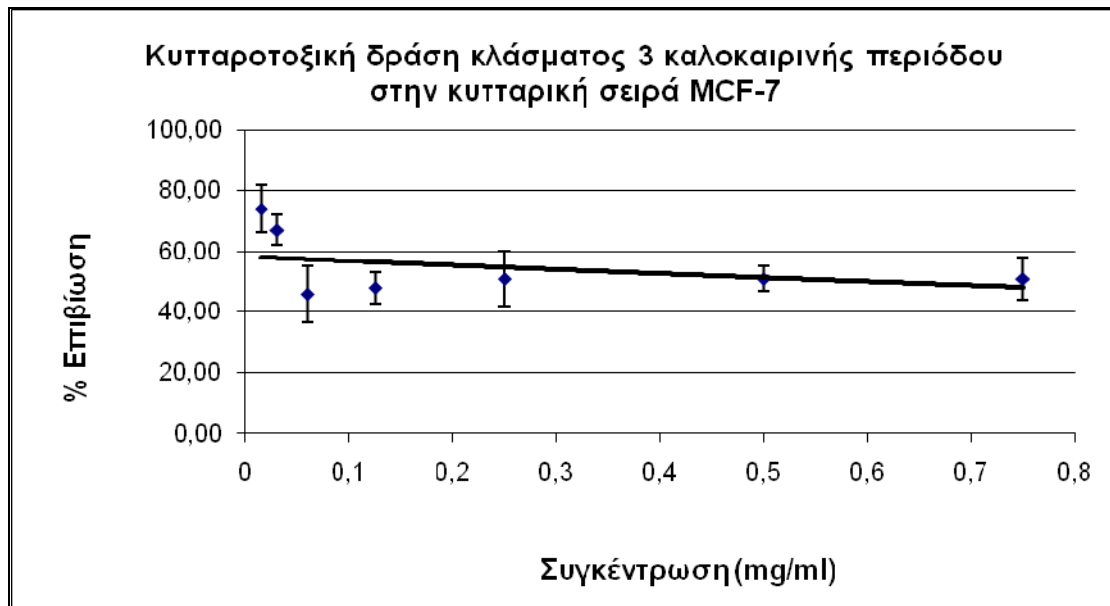
Τα κλάσματα που προέκυψαν από τη μεταχείριση του φυτού κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου (Ιούνιος-Ιούλιος), εμφανίζουν μικρότερη κυτταροτοξική δράση σε σχέση με εκείνα της χειμερινής περιόδου ($p < 0,05$), ενώ η σειρά δραστηριότητας τους παραμένει ίδια. Το χλωροφορμικό κλάσμα 1 και το υδατομεθανολικό κλάσμα 2 της καλοκαιρινής εποχής συγκομιδής εμφανίζουν την ασθενέστερη δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7, με το χλωροφορμικό κλάσμα 1 να είναι ισχυρότερο σε σύγκριση με το υδατομεθανολικό κλάσμα 2 (Γραφήματα 5 και 6) ($p < 0,05$). Το αιθανολικό κλάσμα 3 εμφανίζει σταθερή κυτταροτοξική δράση στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που μελετήθηκε (Γράφημα 7) ενώ το αιθερικό κλάσμα 4 εμφανίζει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση (Γράφημα 8) όπως και κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (DMSO, PBS, Αιθανόλη 60%) δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($p > 0,05$).



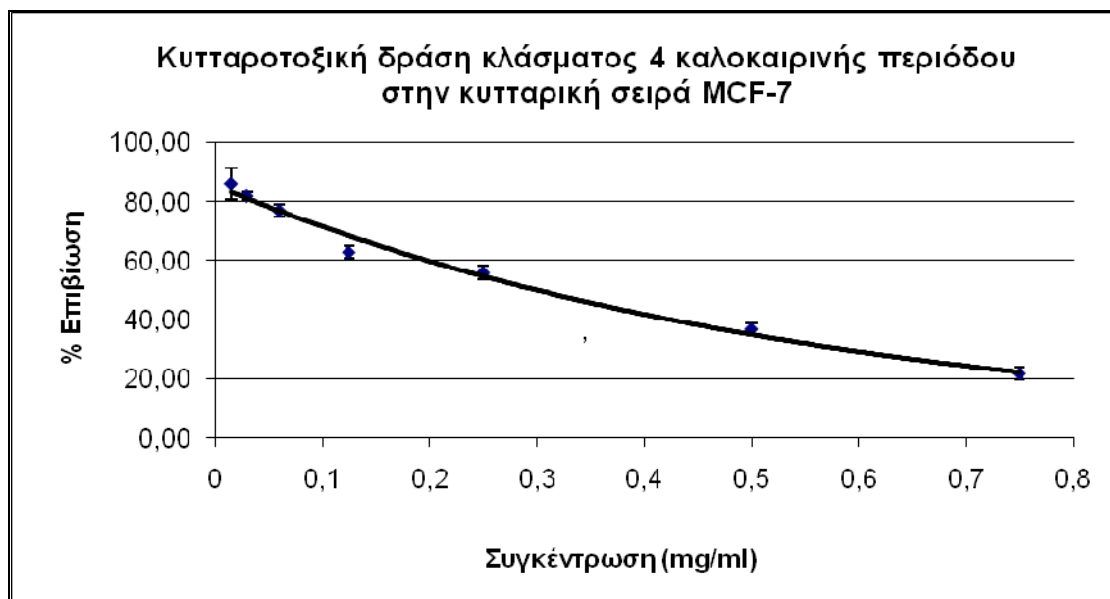
Γράφημα 5. Κυτταροτοξική δράση χλωροφορμικού κλάσματος 1 καλοκαιρινής περιόδου στην καρκινική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} του κλάσματος 1 είναι $6,6 \pm 0,05 \text{ mg/ml}$.



Γράφημα 6. Κυτταροτοξική δράση υδατομεθανολικού κλάσματος 2 καλοκαιρινής εποχής στην καρκινική σειρά MCF-7. Το κλάσμα 2 εμφανίζει ασθενή κυτταροτοξική δράση.



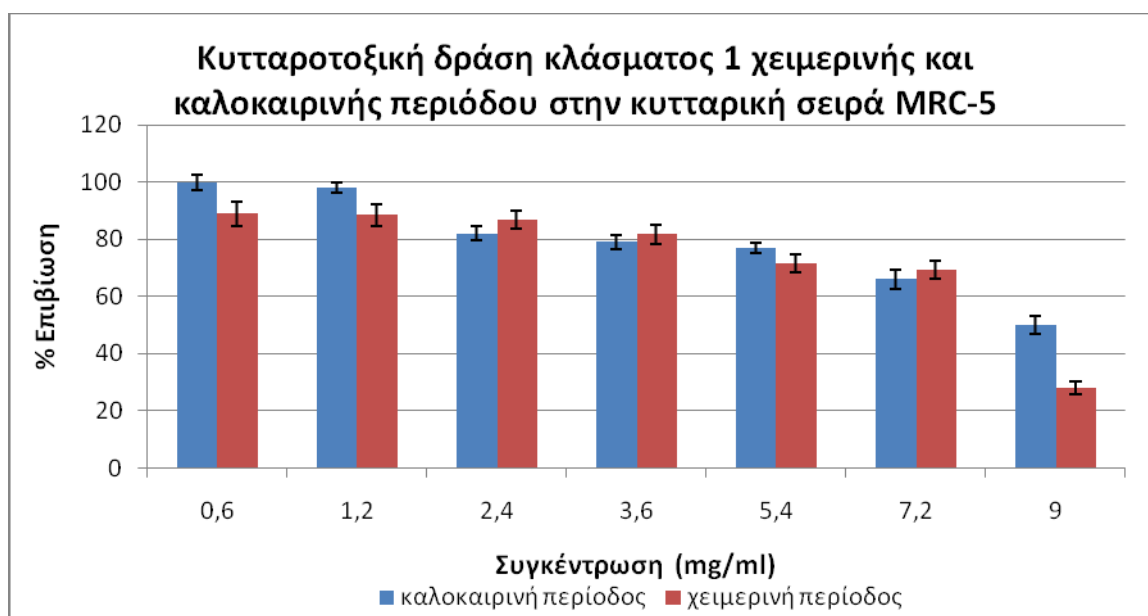
Γράφημα 7. Κυτταροτοξική δράση αιθανολικού κλάσματος 3 καλοκαιρινής εποχής στην καρκινική σειρά MCF-7. Παρατηρείται ότι η κυτταροτοξική δράση του κλάσματος 3 παραμένει σταθερή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις.



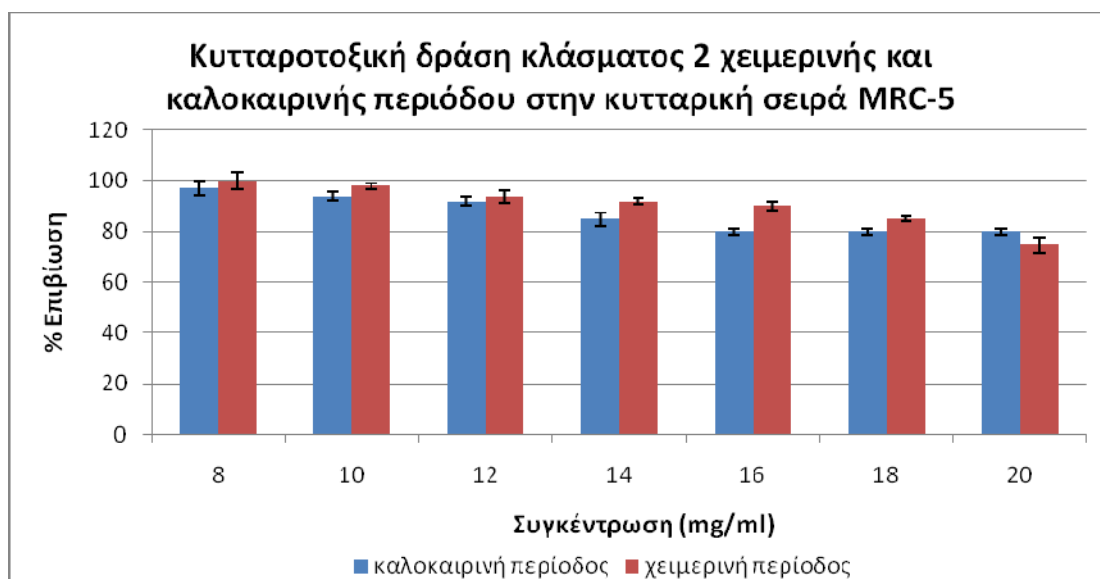
Γράφημα 8. Κυτταροτοξική δράση αιθερικού κλάσματος 4 καλοκαιρινής εποχής στην καρκινική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} του κλάσματος 4 είναι $0,304 \pm 0,01 \text{ mg/ml}$.

Η κυτταροτοξική δράση των τεσσάρων κλασμάτων κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής και της χειμερινής εποχής συγκομιδής σε φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών MRC-5 απεικονίζεται στα γραφήματα 9 έως 12. Παρατηρείται ότι όλα τα

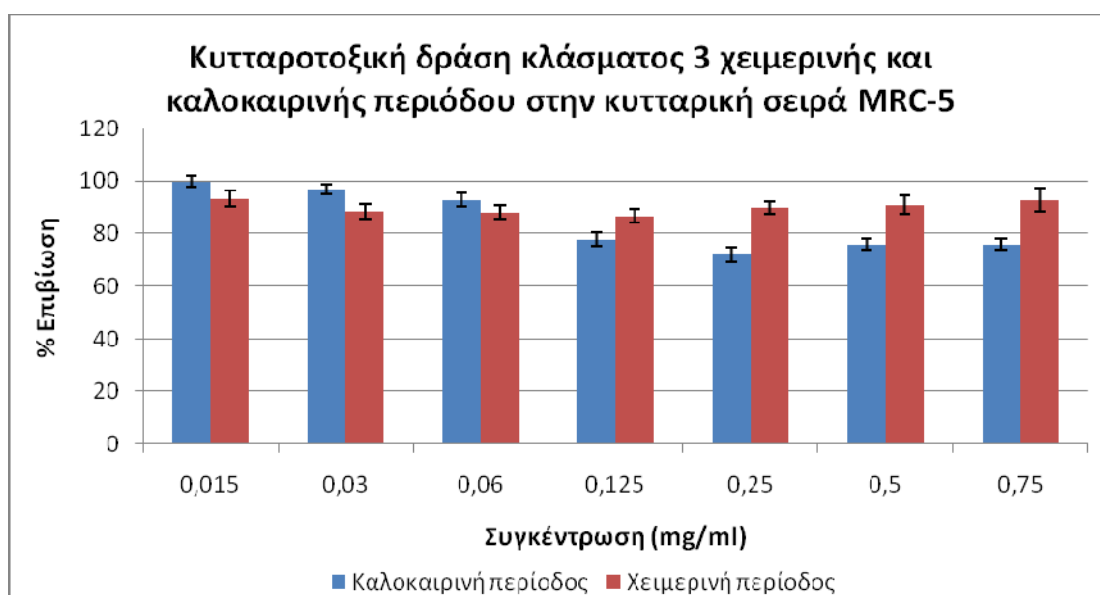
κλάσματα του φυτού έχουν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση κατά τη διάρκεια της χειμερινή περιόδου εκτός από το αιθανολικό κλάσμα 3, του οποίου η δράση αναστέλλεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και είναι ισχυρότερη κατά την καλοκαιρινή περίοδο συγκομιδής. Το χλωροφορμικό κλάσμα 1 το οποίο περιέχει το σύνολο των λιπιδίων του φυτού (Γράφημα 9) και το αιθερικό κλάσμα 4 το οποίο περιέχει τα μη πολικά λιπιδιακά συστατικά (Γράφημα 12) εμφανίζουν την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με το υδατομεθανολικό και το αιθανολικό κλάσμα. Επίσης παρατηρείται ότι η κυτταροτοξική τους δράση μεταβάλλεται με παρόμοιο τρόπο κατά τη χειμερινή εποχή συγκομιδής αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται, το υδατομεθανολικό κλάσμα 2 και το αιθανολικό κλάσμα 3 έχουν ασθενή κυτταροτοξική δράση στους φυσιολογικούς ινοβλάστες κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών συγκομιδής (Γραφήματα 10 και 11).



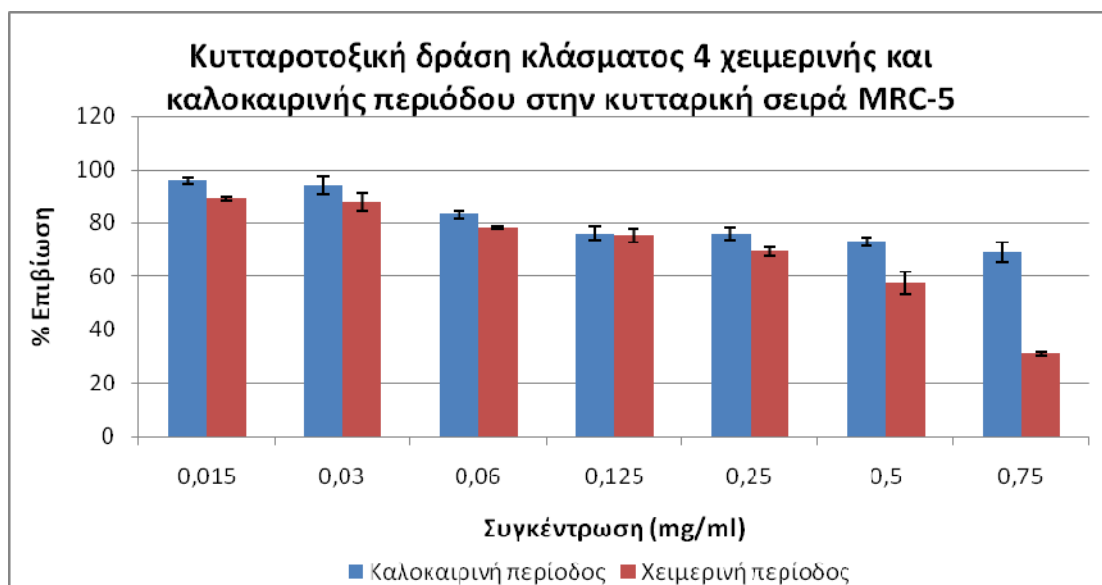
Γράφημα 9. Σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης του χλωροφορμικού κλάσματος 1 και των δύο εποχών στην κυτταρική σειρά MRC-5. Κατά την καλοκαιρινή περίοδο το κλάσμα 1 έχει μικρότερη κυτταροτοξική δράση (τιμή IC_{50} $10 \pm 0,460 \text{ mg/ml}$) σε σύγκριση με εκείνο της χειμερινής εποχής συγκομιδής (τιμή IC_{50} $6,3 \pm 0,153 \text{ mg/ml}$) ($p < 0,05$).



Γράφημα 10. Σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης του υδατομεθανολικού κλάσματος 2 και των δύο εποχών στην κυτταρική σειρά MRC-5. Τα κλάσμα 2 έχει ασθενή κυτταροτοξική δράση στη φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών με το κλάσμα της χειμερινής περιόδου να εμφανίζει ισχυρότερη δράση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ($p<0,05$).



Γράφημα 11. Σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης του αιθανολικού κλάσματος 3 και των δύο εποχών στην κυτταρική σειρά MRC-5. Το κλάσμα 3 και των δύο εποχών εμφανίζει κυτταροτοξική δράση, η οποία αναστέλλεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Παρατηρείται ότι κατά την καλοκαιρινή περίοδο συγκομιδής η κυτταροτοξικότητα είναι ισχυρότερη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε σύγκριση με την χειμερινή εποχή συγκομιδής ($p<0,05$).



Γράφημα 12. Σύγκριση της κυτταροτοξικής δράσης του αιθερικού κλάσματος 4 και των δύο εποχών στην κυτταρική σειρά MRC-5. Κατά τη χειμερινή περίοδο το κλάσμα 4 εμφανίζει ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση (τιμή IC_{50} $0,457 \pm 0,01 \text{ mg/ml}$) σε σχέση με την καλοκαιρινή περίοδο συγκομιδής (τιμή IC_{50} $1,118 \pm 0,06 \text{ mg/ml}$) ($p < 0,05$).

Η κυτταροτοξική δράση των τεσσάρων κλασμάτων και των δύο εποχών συγκομιδής στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MRC-5 απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα. Συνοπτικά συμπεραίνονται τα εξής:

- Μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά και στα φυσιολογικά κύτταρα εμφανίζουν τα κλάσματα της χειμερινής εποχής συγκομιδής, με εξαίρεση το κλάσμα 3 του οποίου η δράση στα φυσιολογικά κύτταρα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού είναι ισχυρότερη.
- Την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών συγκομιδής εμφανίζει το μη πολικό, ουδέτερο κλάσμα 4 (αιθερικό κλάσμα).

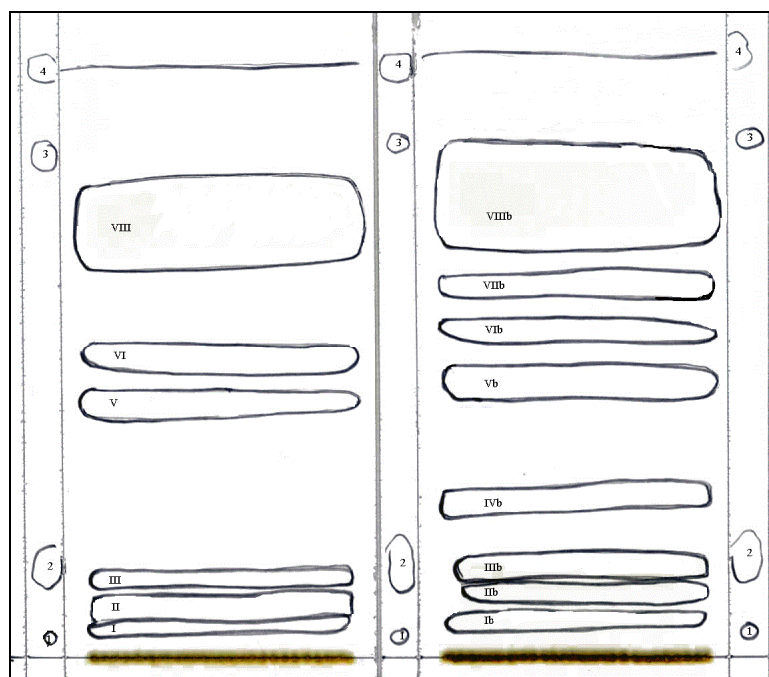
Πίνακας 2. Επί τοις εκατό ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων MCF-7 και MRC-5, έπειτα από επώαση τους με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των τεσσάρων κλάσμάτων.

Κλάσματα	Συγκέντρωση (mg/ml)	% Επιβίωση			
		MCF-7 κύτταρα		MRC-5 κύτταρα	
		Χειμώνας	Καλοκαίρι	Χειμώνας	Καλοκαίρι
Κλάσμα 1	9	2±2,67	43±2,53	28±2,06	50±3,28
Κλάσμα 2	20	13±7,2	80±2,97	74±3,12	80±1,26
Κλάσμα 3	0,75	13,5±2,12	51±7,04	93±4,46	76±1,92
Κλάσμα 4	0,75	1±5,4	22±2,04	31±0,68	69±3,81

3.3 Αποτελέσματα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, το αιθερικό κλάσμα 4 της χειμερινής και της καλοκαιρινής περιόδου, εφόσον φέρει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση, αναλύεται περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, για τον διαχωρισμό των λιπιδιακών συστατικών του.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αποκαλύπτει την ύπαρξη έξι ζωνών για το κλάσμα 4 του καλοκαιρινού φυτού (ζώνες I, II, III, V, VI, VIII) και οχτώ για το κλάσμα 4 του χειμερινού φυτού (ζώνες Ib, IIb, IIIb, IVb, Vb, VIb, VIIb, VIIIb) (εικόνα 1). Όπως φαίνεται από την εικόνα της χρωματογραφικής πλάκας, οι ζώνες IVb και VIIb (και τα αντίστοιχα λιπίδια συνεπώς) του χειμερινού κλάσματος δεν υπάρχουν στο καλοκαιρινό υδρόφοβο κλάσμα.



Εικόνα 1. αριστερά: αιθερικό κλάσμα 4 καλοκαιρινού φυτού (ζώνες I-VIII), δεξιά: αιθερικό κλάσμα 4 χειμερινού φυτού (ζώνες Ib-VIIIb). Μίγμα πρότυπου διαλύματος, από κάτω προς τα πάνω: χοληστερόλη, 1, εστέρας της χοληστερόλης, 2, τρικαπριλίνη, 3, εικοσιεννεάνιο, 4.

Οι τιμές RF κάθε ζώνης παρατίθενται στον πίνακα 3 και υπολογίζονται με βάση την εξίσωση: $RF = \frac{\text{απόσταση που διένυσε η ζώνη/απόσταση που διένυσε ο διαλύτης}}{\text{απόσταση που διένυσε η ζώνη/απόσταση που διένυσε ο διαλύτης}}$. Με την ίδια εξίσωση υπολογίζονται και οι τιμές RF των κηλίδων, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν:

Rf χοληστερόλης: $0,07 \pm 0,01$

Rf εστέρα χοληστερόλης: $0,27 \pm 0,01$

Rf τρικαπριλίνης: $0,87 \pm 0,04$

Rf εικοσιεννεανίου: 1

Παρατηρείται ότι οι τιμές RF των ζωνών I και Ib αντιστοιχούν στην τιμή RF της χοληστερόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Επίσης οι ζώνες III και IIIb παρουσιάζουν παρόμοια τιμή RF με τον εστέρα της χοληστερόλης ενώ οι ζώνες VIII και VIIIb εμφανίζουν παρόμοια τιμή RF με την τρικαπριλίνη. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα λιπιδιακά συστατικά που διαχωρίστηκαν με TLC εμφανίζουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τις αντίστοιχες πρότυπες ουσίες.

Πίνακας 3. Τιμές RF κάθε ζώνης που εμφανίζεται στη πλάκα χρωματογραφίας. Παρατηρείται ότι οι τιμές RF των αντίστοιχων ζωνών κάθε εποχής δεν αποκλίνουν σημαντικά ($p>0,05$).

TIMEΣ RF ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 4		TIMEΣ RF ΧΕΙΜΕΡΙΝΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ 4	
RF Ζώνης I	0,08±0,01	RF Ζώνης Ib	0,07±0,01
RF Ζώνης II	0,14±0,01	RF Ζώνης IIb	0,15±0,01
RF Ζώνης III	0,22±0,01	RF Ζώνης IIIb	0,27±0,01
	-	RF Ζώνης IVb	0,37±0,01
RF Ζώνης V	0,52±0,01	RF Ζώνης Vb	0,59±0,01
RF Ζώνης VI	0,60±0,01	RF Ζώνης VIb	0,68±0,01
	-	RF Ζώνης VIIb	0,75±0,01
RF Ζώνης VIII	0,78±0,02	RF Ζώνης VIIIb	0,85±0,03

Να αναφέρουμε επίσης ότι το χλωροφορμικό κλάσμα 1 και το αιθανολικό κλάσμα 3 της χειμερινής περιόδου αναλύθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας ως πρότυπες ουσίες τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), τη λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC), τη σφιγγομυελίνη (Sph) και τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) (της εταιρίας Sigma) σε αναλογία 1mg/ml χλωροφορμίου:μεθανόλης (1:1) και χρησιμοποιώντας τους διαλύτες χλωροφόρμιο: μεθανόλη: δισαπενταγμένο νερό (65:25:4) για τον κορεσμό του θαλάμου ανάπτυξης. Η TLC αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων ζωνών για το χλωροφορμικό κλάσμα 1 και έξι ζωνών για το αιθανολικό κλάσμα 3, αλλά λόγω της μικρής κυτταροτοξικής τους δράσης στην καρκινική σειρά του μαστού MCF-7 δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω μελέτη τους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι:

- Κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου απουσιάζουν δύο λιπιδιακά συστατικά από το φυτό. Το γεγονός αυτό πιθανών να οφείλεται στους μηχανισμούς απόκρισης του φυτού στο κρύο.
- Κάποια λιπιδιακά συστατικά φέρουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τις πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν.

3.4 Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των απομονωθέντων λιπιδιακών συστατικών

Ο πίνακας 4 απεικονίζει τη συγκέντρωση των λιπιδιακών συστατικών που απομονώθηκαν από τα υδρόφοβα κλάσματα του φυτού *Viscum album* κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής και χειμερινής περιόδου η οποία υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Όπως παρατηρείται, οι συγκεντρώσεις των λιπιδιακών συστατικών κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές της χειμερινής περιόδου. Τα λιπιδιακά συστατικά της ζώνης VI έχουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν τα λιπίδια II και V κατά την καλοκαιρινή εποχή συγκομιδής και το λιπίδιο IIb κατά τη χειμερινή περίοδο.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των λιπιδιακών συστατικών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής και της χειμερινής περιόδου ανά γραμμάριο φύλλων του φυτού ($p < 0,05$).

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (mg λιπιδίου/g φυτού)			
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ		ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΕΠΟΧΗ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	
Ζώνη I	15,98± 0,008	Ζώνη Ib	49,73±0,015
Ζώνη II	19,24±0,048	Ζώνη IIb	54,12±0,072
Ζώνη III	19,21±0,048	Ζώνη IIIb	52,32±0,052
Ζώνη IV	-	Ζώνη IVb	46,12±0,022
Ζώνη V	19,24±0,065	Ζώνη Vb	39,06±0,058
Ζώνη VI	9,52±0,012	Ζώνη VIb	24,69±0,019
Ζώνη VII	-	Ζώνη VIIb	43,23±0,049
Ζώνη VIII	19,14±0,046	Ζώνη VIIIb	53,26±0,015

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι:

- Κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου η ποσότητα των λιπιδιακών συστατικών είναι έως και τρεις φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με την καλοκαιρινή περίοδο.

3.5 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης των απομονωθέντων λιπιδιακών συστατικών με τη μέθοδο του MTT

Πριν την πειραματική διαδικασία, κατάλληλες ποσότητες των χλωροφορμικών διαλυμάτων που περιέχουν τα λιπιδιακά συστατικά (έπειτα από την κατεργασία κάθε ζώνης της TLC) εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Τα ιζήματα που προκύπτουν επαναιωρούνται σε DMSO και θρεπτικό υλικό DMEM σε αναλογία 1:100 και έπειτα ομογενοποιούνται με τη χρήση υπερήχων.

Στους πίνακες 5 και 6 παρατίθενται οι τιμές IC_{50} των λιπιδιακών συστατικών του φυτού που απομονώθηκαν κατά τη καλοκαιρινή και χειμερινή εποχή συγκομιδής αντίστοιχα στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MRC-5. Τα λιπιδιακά συστατικά με τη μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα είναι εκείνα της χειμερινής περιόδου, ενώ η τοξικότητα τους στους φυσιολογικούς ινοβλάστες είναι αρκετά μικρή, με εξαίρεση το λιπίδιο IVb το οποίο φέρει τοξική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα λιπιδιακά συστατικά που απομονώθηκαν κατά τη καλοκαιρινή περίοδο έχουν μειωμένη τοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα, ενώ παρατηρείται αύξηση της κυτταροτοξικότητας τους στους φυσιολογικούς ινοβλάστες σε σχέση με εκείνη της χειμερινής περιόδου. Τα διαγράμματα που απεικονίζουν την κυτταροτοξική δράση κάθε λιπιδιακού συστατικού παρατίθενται στο Παράρτημα.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι οι κυτταροτοξικές ιδιότητες των περισσότερων λιπιδιακών συστατικών δεν ήταν επαναλήψιμες σε κάθε νέα συγκομιδή του φυτού. Τα λιπιδιακά συστατικά τα οποία εμφάνιζαν επαναλήψιμα αποτελέσματα ήταν τα λιπίδια III, IIIb, IVb, V και Vb. Δεδομένου ότι το λιπιδιακό συστατικό IVb εμφάνιζε ισχυρή κυτταροτοξική δράση στην φυσιολογική κυτταρική σειρά MRC-5 δεν μελετήθηκε περαιτέρω, ενώ επικεντρωθήκαμε στο λιπιδιακό συστατικό Vb της χειμερινής περιόδου, το οποίο εμφάνιζε ισχυρή κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και ασθενή δράση στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5.

Πίνακας 5. Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των λιπιδιακών συστατικών του φυτού που απομονώθηκαν κατά την καλοκαιρινή περίοδο (p<0,05), (*p>0,05).

Λιπιδιακά συστατικά απομονωμένα κατά την καλοκαιρινή εποχή συγκομιδής	Τιμές IC ₅₀ (mg/ml)	
	MCF-7 κύτταρα	MRC-5 κύτταρα
I	0,310±0,012	0,492±0,027
II	0,487±0,019	0,550±0,027
III	0,421±0,020*	0,420±0,020*
V	0,255±0,033	0,277±0,020
VI	0,362±0,017	0,169±0,018
VIII	0,395±0,014	0,511±0,019

Πίνακας 6. Τιμές IC₅₀ (mg/ml) των λιπιδιακών συστατικών του φυτού που απομονώθηκαν κατά την χειμερινή περίοδο (p<0,05).

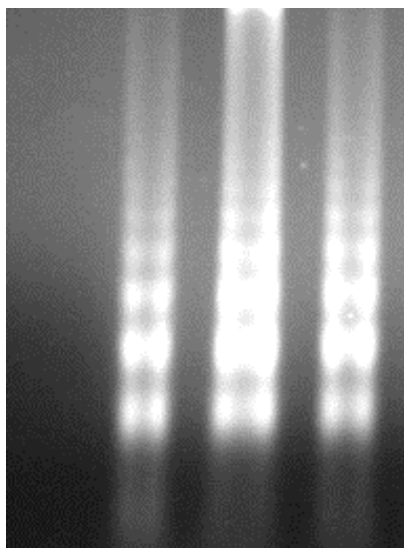
Λιπιδιακά συστατικά απομονωμένα κατά την χειμερινή εποχή συγκομιδής	Τιμές IC ₅₀ (mg/ml)	
	MCF-7 κύτταρα	MRC-5 κύτταρα
Ib	0,420±0,059	1,320±0,028
IIb	0,271±0,029	1,385±0,039
IIIb	0,242±0,022	2,159±0,037
IVb	0,065±0,024	0,088±0,036
Vb	0,160±0,017	0,556±0,027
VIb	0,265±0,032	0,330±0,043
VIIb	0,623±0,048	0,725±0,044
VIIIb	1,393±0,039	1,662±0,081

Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι:

- Τα λιπιδιακά συστατικά που απομονώθηκαν την χειμερινή περίοδο εμφανίζουν ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και ασθενέστερη στους φυσιολογικούς ινοβλάστες.
- Ισχυρή κυτταροτοξική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές παρουσιάζει το λιπιδιακό συστατικό IVb, το οποίο εμφανίζεται μόνο κατά τη χειμερινή περίοδο.
- Κατά την καλοκαιρινή περίοδο η κυτταροτοξική δράση των λιπιδιακών συστατικών αυξάνεται στα φυσιολογικά κύτταρα και μειώνεται στα καρκινικά.
- Το λιπιδιακό συστατικό με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα και την ασθενέστερη στα φυσιολογικά είναι το λιπίδιο Vb.

3.6 Αποτελέσματα μηχανισμού κυτταρικού θανάτου του λιπιδιακού συστατικού Vb μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

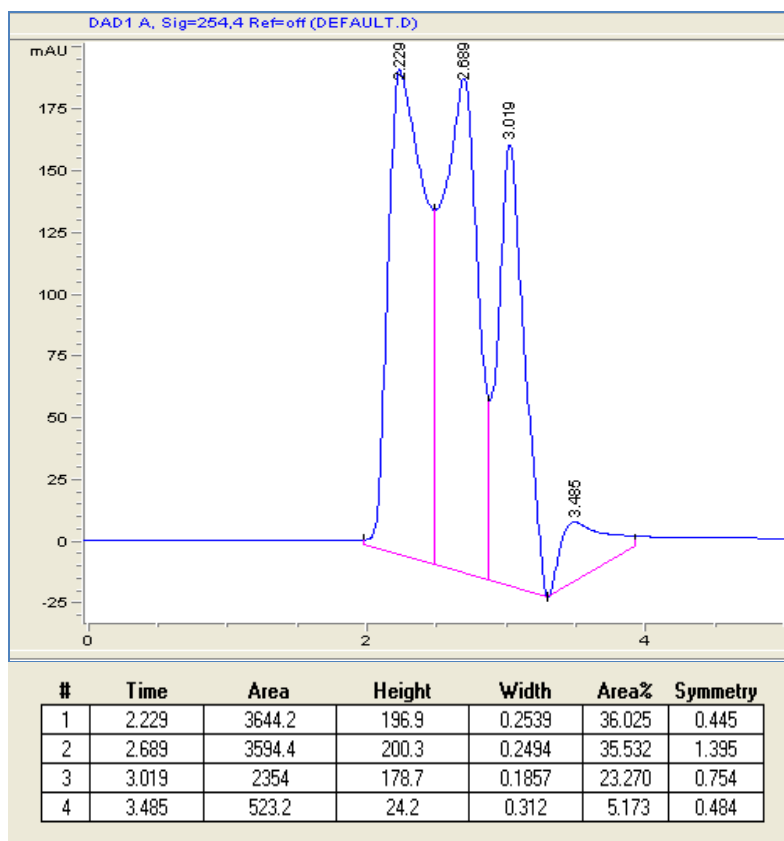
Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης αποκαλύπτει ότι ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί το λιπιδιακό συστατικό Vb στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 είναι ο αποπτωτικός (Εικόνα 2). Οι ζώνες που εμφανίζονται στο πήκτωμα της αγαρόζης αντιπροσωπεύουν τα θραύσματα του DNA έπειτα από τον κατακερματισμό του.



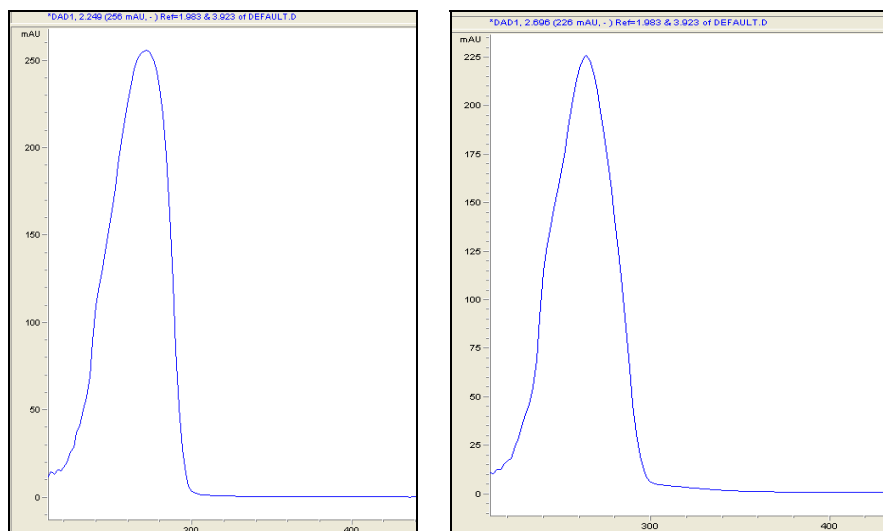
Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση DNA καρκινικών κυττάρων MCF-7 σε πήκτωμα αγαρόζης, έπειτα από επώαση τους με 0μg, 20μg, 160μg και 500μg του λιπιδιακού συστατικού Vb (από αριστερά προς δεξιά). Οι ζώνες που εμφανίζονται υποδηλώνουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο

3.7 Αποτελέσματα Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb

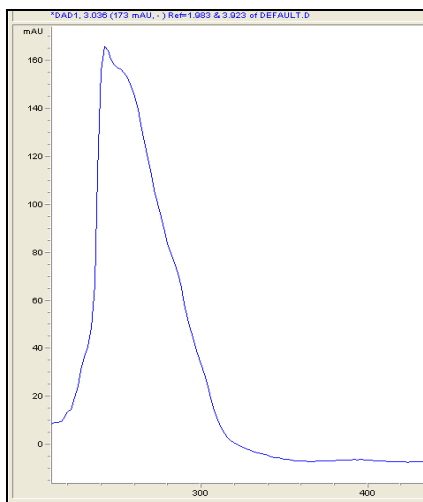
Το άγνωστο λιπιδιακό συστατικό Vb της χειμερινής περιόδου αναλύεται περαιτέρω με την μέθοδο της RP-HPLC. Το χρωματογράφημα 1 απεικονίζει το φάσμα του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb στη συγκέντρωση των 22mg/ml και σε μήκος κύματος 254nm. Όπως παρατηρείται στο χρωματογράφημα, εμφανίζονται τρεις κορυφές, καθώς και μία τέταρτη κατά πολύ μικρότερη των υπολοίπων. Το ανώτερο σημείο της πρώτης κορυφή εμφανίζεται στο 2.229 λεπτό, της δεύτερης κορυφής στο 2.689 λεπτό, της τρίτης στο 3.019 λεπτό και της τέταρτης στο 3.485 λεπτό. Τα χρωματογραφήματα 2, 3 και 4 αποτελούν τα UV φάσματα των τριών εμφανών κορυφών του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού. Όπως παρατηρείται, η μέγιστη ένταση της απορρόφησης της πρώτης κορυφής είναι 256mAU, της δεύτερης 226mAU και της τρίτης 173mAU.



Χρωματογράφημα 1. Φάσμα άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb.



Χρωματογραφήματα 2 και 3. UV φάσμα πρώτης κορυφής του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb (αριστερά) και UV φάσμα δεύτερης κορυφής (δεξιά). Παρατηρούμε ότι η μέγιστη απορρόφηση της πρώτης κορυφής είναι στα 275nm ενώ της δεύτερης κορυφής στα 264nm.



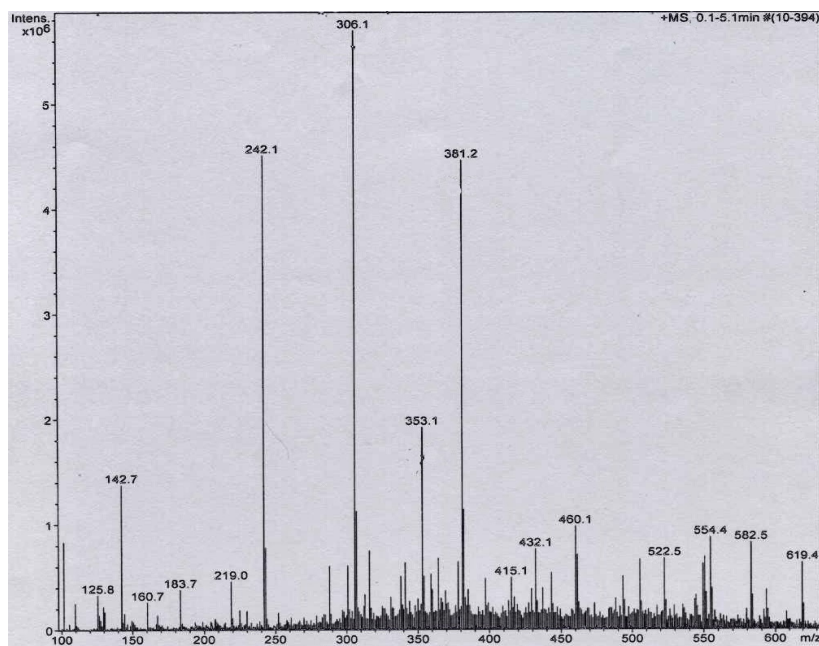
Χρωματογράφημα 4. UV φάσμα τρίτης κορυφής του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb. Η μέγιστη απορρόφηση της τρίτης κορυφής είναι στα 242nm.

3.8 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Μάζας (ESI-MS) του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb

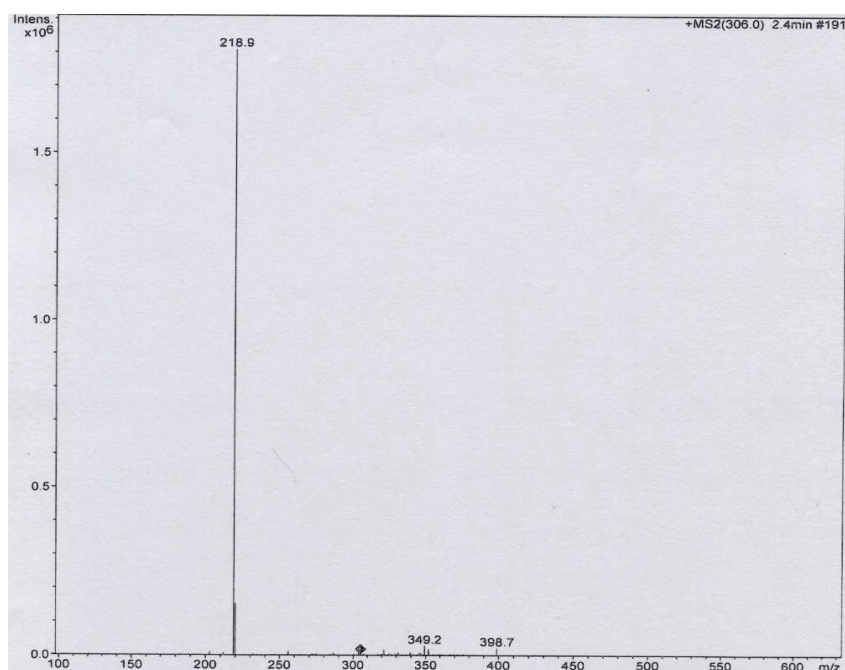
Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την RP-HPLC και τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή που εμφανίστηκε, αναλύονται περαιτέρω με φασματοσκοπία μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Από τα φάσματα μάζας που προκύπτουν και σύμφωνα με τα δεδομένα όλων των προηγούμενων διεργασιών, συμπεραίνουμε ότι το άγνωστο ουδέτερο λιπιδιακό συστατικό που απομονώθηκε είναι ένα διτερπένιο, πιθανά δομικά ανάλογο του διτερπενίου σκλαρεόλη.

Δεδομένου ότι ο μοριακός τύπος της σκλαρεόλης είναι $C_{20}H_{36}O_2$, οι πιθανοί μοριακοί τύποι του διτερπενίου που απομονώθηκε από το φυτό είναι: $C_{20}H_{32}O_2$ και $C_{20}H_{33}O_2$.

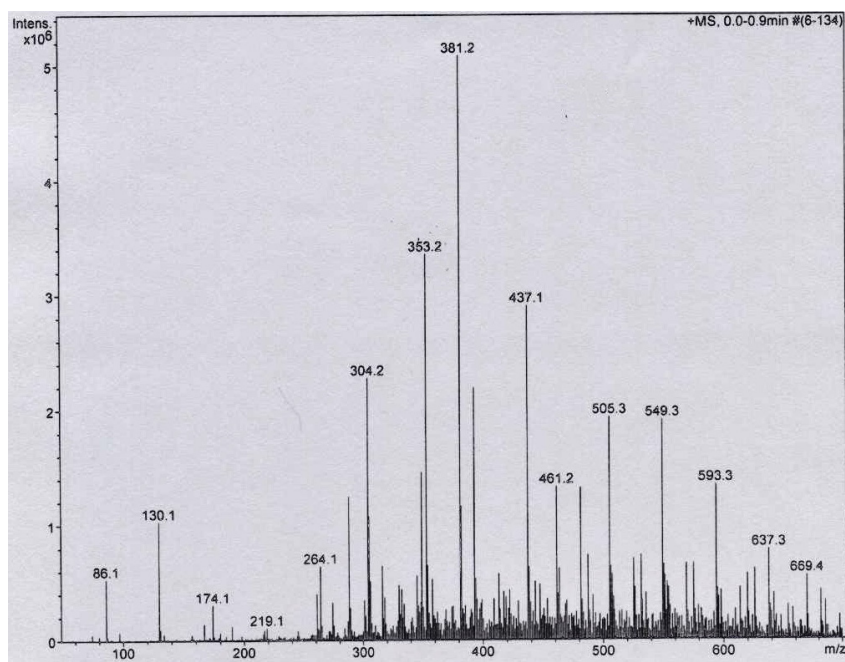
Τα παρακάτω σχήματα απεικονίζουν ενδεικτικά το φάσμα μάζας του άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb καθώς επίσης και το φάσμα μάζας του μίγματος των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.



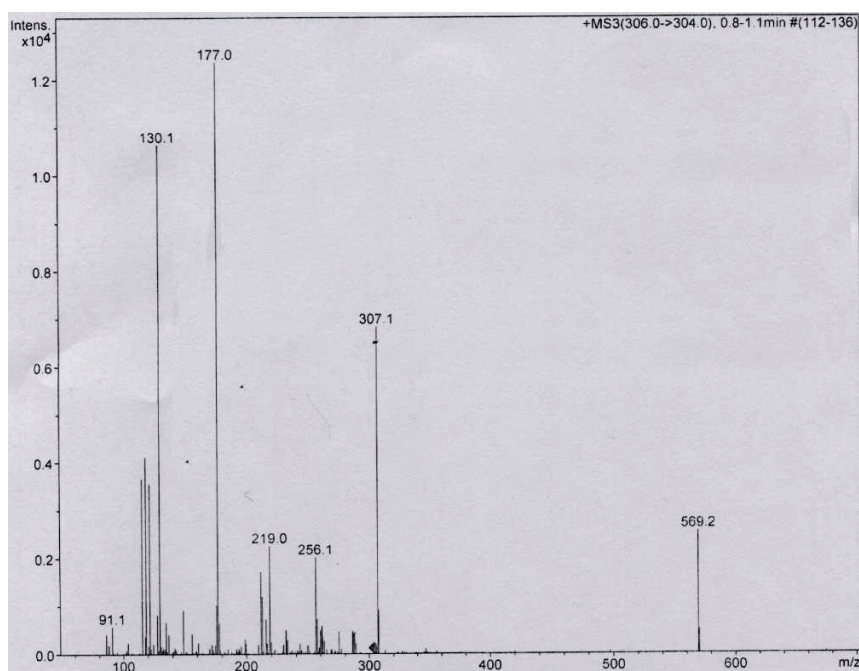
Σχήμα 2. Φάσμα μάζας άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}O_2$. Το μοριακό βάρος του άγνωστου διτερπενίου είναι $305+[H^+]$.



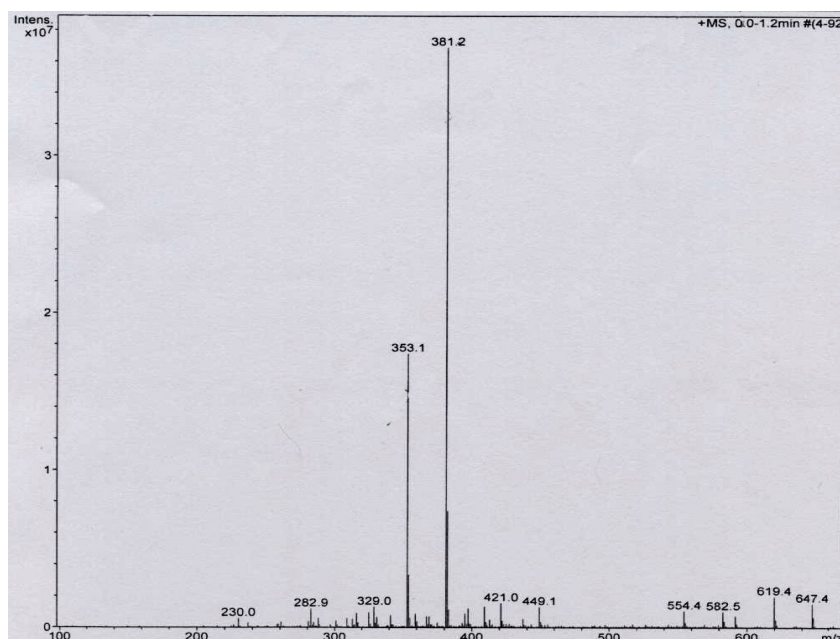
Σχήμα 3. Φάσμα μάζας θραύσματος άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}O_2$. Το μοριακό βάρος του θραύσματος είναι 218,9.



Σχήμα 4. Φάσμα μάζας άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{32}O_2$. Το μοριακό βάρος του άγνωστου διτερπενίου είναι 304,2.



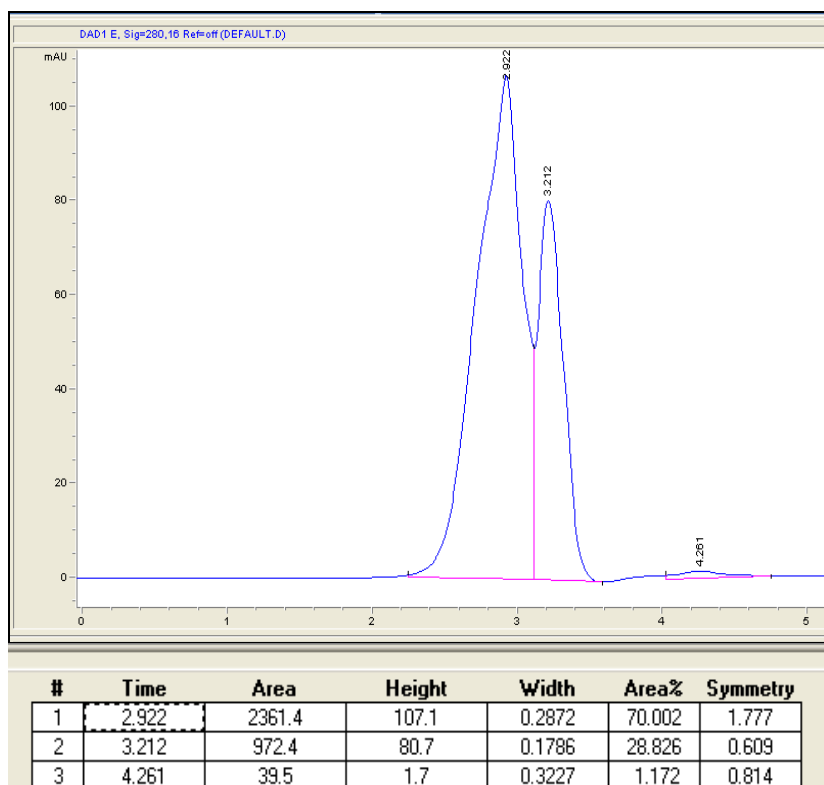
Σχήμα 5. Φάσμα μάζας άγνωστου λιπιδιακού συστατικού Vb, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}O_2$. Το μοριακό βάρος του άγνωστου διτερπενίου είναι $305 + 2[H^+]$.



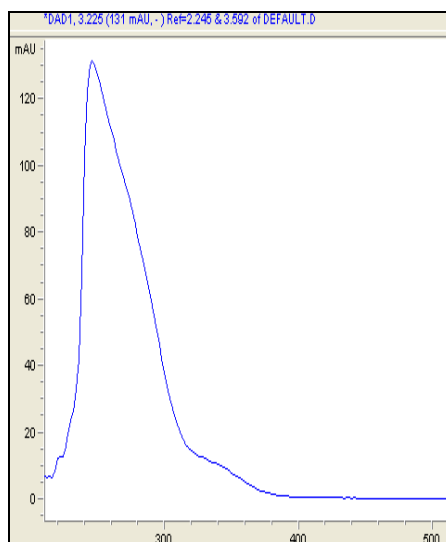
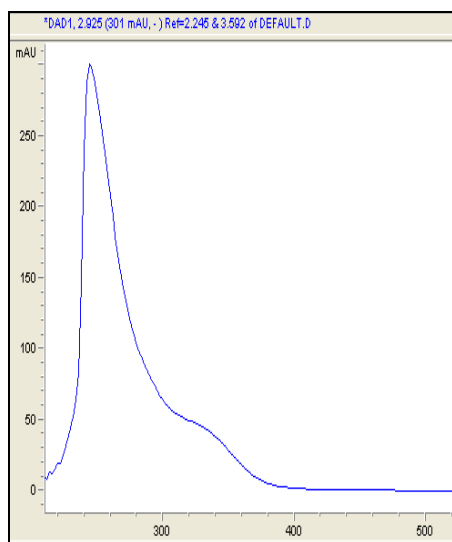
Σχήμα 6. Φάσμα μάζας διαλυτών. Το μοριακό βάρος του μίγματος των δύο διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε είναι 353,1 και 381,2.

3.9 Αποτελέσματα Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) της σκλαρεόλης

Το χρωματογράφημα 5 αντιπροσωπεύει το φάσμα της σκλαρεόλης που βρίσκεται στο εμπόριο, στη συγκέντρωση των 100mg/ml και σε μήκος κύματος 280nm. Παρουσιάζονται δύο κορυφές καθώς και μία τρίτη κατά πολύ μικρότερη. Το ανώτερο σημείο της πρώτης κορυφής εμφανίζεται στο 2.922 λεπτό, της δεύτερης στο 3.212 λεπτό και της τρίτης στο 4.261 λεπτό. Τα χρωματογραφήματα 6 και 7 αντιπροσωπεύουν τα UV φάσματα των δύο εμφανών κορυφών της σκλαρεόλης. Παρατηρείται ότι η πρώτη και η δεύτερη κορυφή της σκλαρεόλης εμφανίζονται σε πολύ κοντινά χρονικά σημεία με την δεύτερη και την τρίτη κορυφή αντίστοιχα του απομονωμένου λιπιδιακού συστατικού Vb. Επιπλέον, η πρώτη κορυφή έχει ένταση απορρόφησης 301mAU, ενώ η δεύτερη 131mAU.



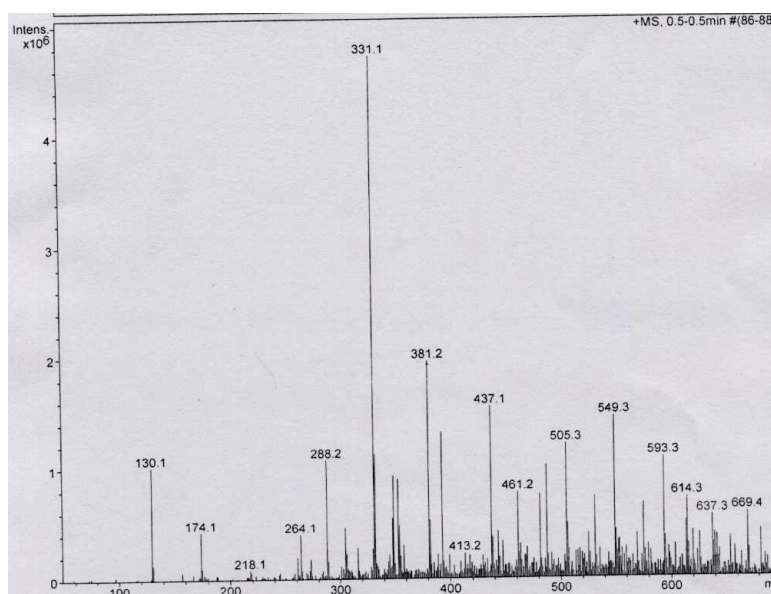
Χρωματογράφημα 5. Φάσμα σκλαρεόλης



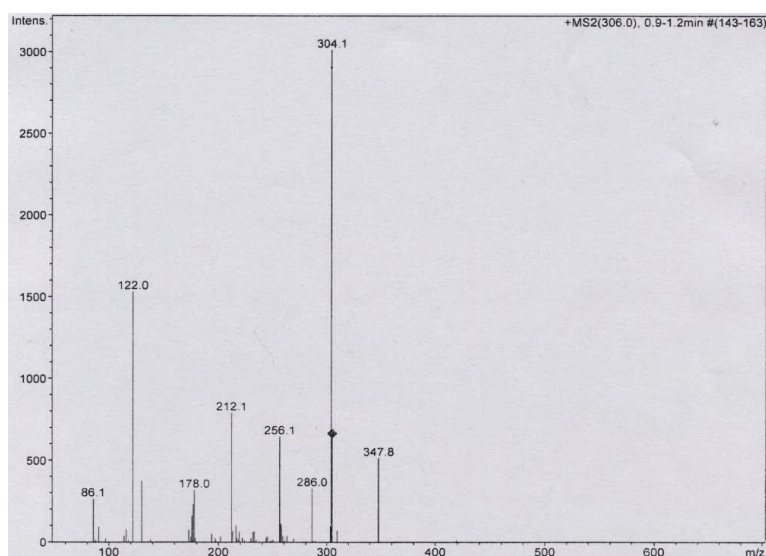
Χρωματογραφήματα 6 και 7. UV φάσμα πρώτης κορυφής της σκλαρεόλης (αριστερά) και δεύτερης κορυφής της σκλαρεόλης (δεξιά). Η μέγιστη απορρόφηση των δύο κορυφών είναι στα 247nm.

3.10 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας μάζας (ESI-MS) της σκλαρεόλης

Παρακάτω απεικονίζεται το φάσμα μάζας της σκλαρεόλης η οποία υπάρχει στο εμπόριο. Το μοριακό βάρος της σκλαρεόλης σύμφωνα με στο σχήμα 7 είναι 331.1 λόγω πρόσληψης ενός νατρίου, ενώ το πραγματικό μοριακό βάρος της είναι 308,5. Το σχήμα 8 απεικονίζει το θραύσμα της σκλαρεόλης, το οποίο έχει μοριακό βάρος 304.1.



Σχήμα 7. Φάσμα μάζας σκλαρεόλης. Το μοριακό βάρος είναι $308,5 + [\text{Na}^+]$.



Σχήμα 8. Φάσμα μάζας θραύσματος σκλαρεόλης. Το μοριακό βάρος του θραύσματος της σκλαρεόλης είναι 304,1.

Συνοπτικά συμπεραίνουμε τα εξής:

- Το άγνωστο λιπιδιακό συστατικό Vb είναι ένα διτερπένιο, δομικά ανάλογο του διτερπενίου σκλαρεόλη.
- Ο μοριακός τύπος της σκλαρεόλης είναι $C_{20}H_{36}O_2$, ενώ οι πιθανοί μοριακοί τύποι του διτερπενίου που απομονώθηκε από το φυτό είναι: $C_{20}H_{32}O_2$ και $C_{20}H_{33}O_2$.
- Το μοριακό βάρος της σκλαρεόλης είναι 308,5 ενώ τα πιθανά μοριακά βάρη του διτερπενίου που απομονώθηκε από το φυτό είναι 304,2 και 305.

Λόγω του υψηλού κόστους στην απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων του διτερπενίου από το φυτό (καθώς η ποσότητα που απομονώνεται από μία χρωματογραφική πλάκα κατά την χειμερινή περίοδο είναι μέχρι 0,908mg ενώ κατά την καλοκαιρινή περίοδο είναι μέχρι 0,541mg), λόγω της μη καθαρής μορφής του (καθώς για την απομόνωση του χρησιμοποιούνται διάφοροι διαλύτες αλλά υπάρχει και το ενδεχόμενο να υπάρχουν υπολείμματα από το πυριτικό οξύ της χρωματογραφικής πλάκας), λόγω της χρήσης μεγαλύτερων ποσοτήτων της απομονωθείσας ουσίας σε σχέση με την καθαρή μορφή της (διότι λόγω των προσμίξεων που πιθανώς να φέρει έχει μειωμένη δραστηριότητα σε σχέση με την καθαρή μορφή της) και λόγω της ταχείας οξειδωσης της (γεγονός που απαιτεί την συνεχή παραγωγή μικρών ποσοτήτων της κάθε φορά και την άμεση αξιοποίηση της), όλες οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται με το δομικά ανάλογο διτερπένιο σκλαρεόλη που υπάρχει στο εμπόριο.

3.11 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης της σκλαρεόλης με τη μέθοδο του MTT

Οι συγκεντρώσεις της σκλαρεόλης που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των παρακάτω αποτελεσμάτων είναι οι εξής:

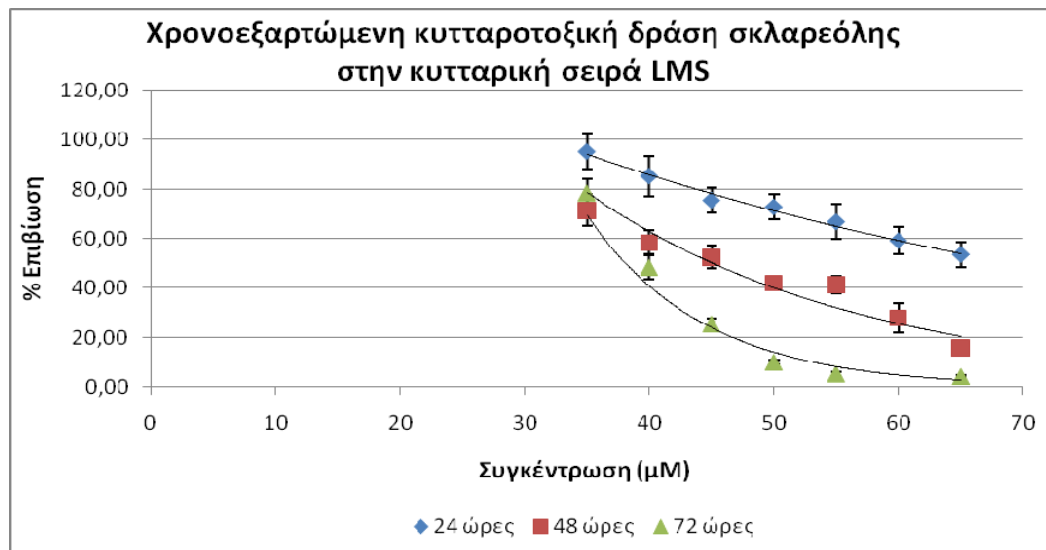
35μM, 40μM, 45μM, 50μM, 55μM, 60μM, 65μM, 70μM, 75μM, 80μM και 85μM

Ο πίνακας 7 απεικονίζει τις τιμές IC_{50} της σκλαρεόλης στις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7, U2OS και HeLa και MRC-5 έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης της ουσίας με τα κύτταρα.

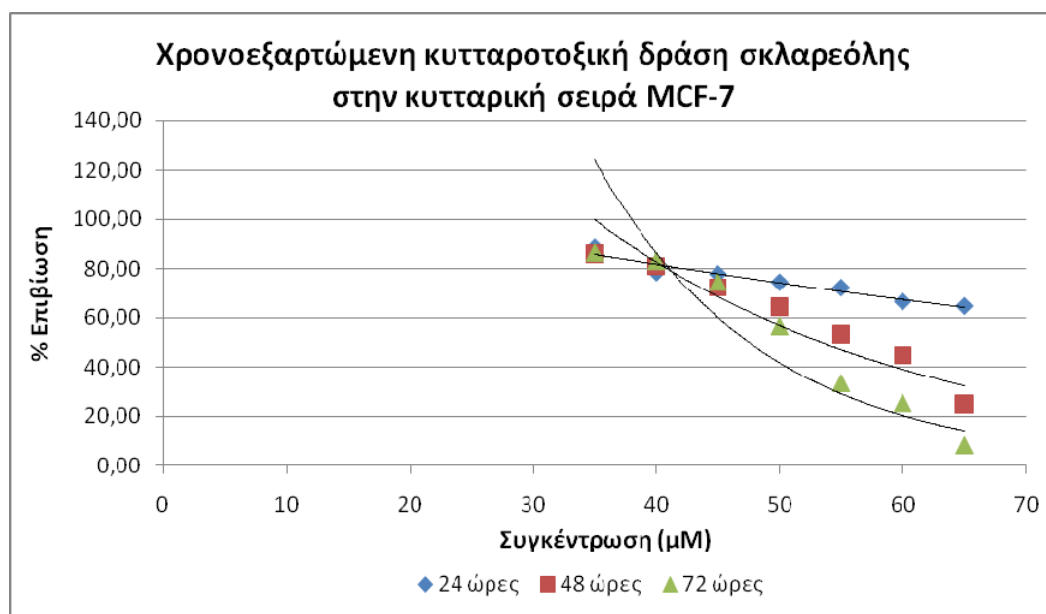
Πίνακας 7. Τιμές IC₅₀ έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης της σκλαρεόλης με τις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7, U2OS, HeLa και MRC-5, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT.

Κυτταρική σειρά Χρόνος Επώασης	LMS	MCF-7	U2OS	HeLa	MRC-5
24ώρες	69,4±1,3μM	87±1,56μM	51±1,12μM	88,7±2,31μM	75±2,75μM
48ώρες	46 ±1,78μM	53,23±0,97μM	44,6±1,31μM	78,6±1,98μM	71,3±2,34μM
72ώρες	38,8±1,6μM	48±1,42μM	40,1±1,19μM	49,3±2,10μM	64,3±0,96μM

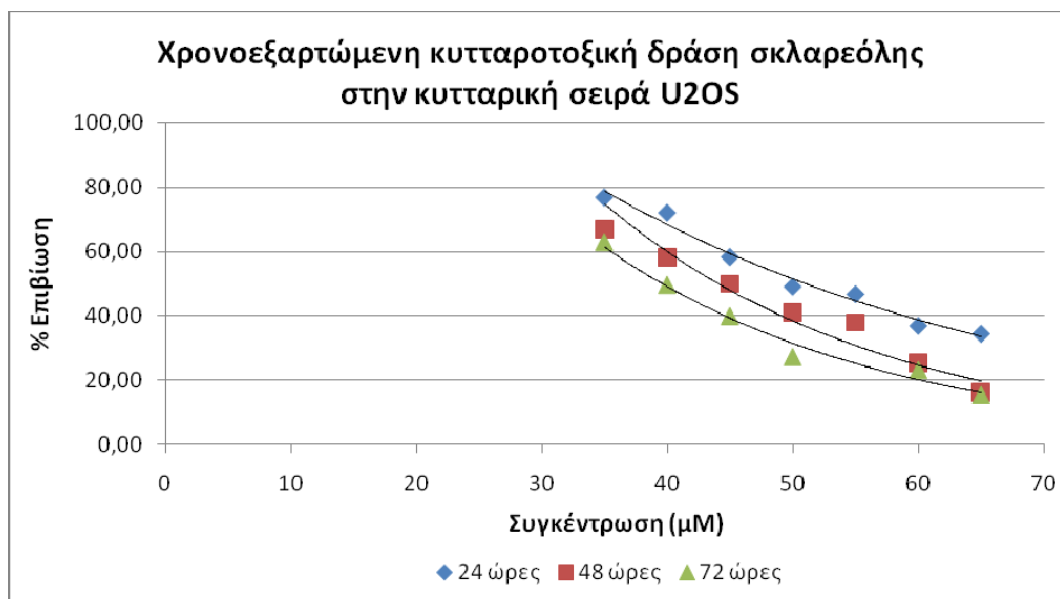
Οι τιμές IC₅₀ του πίνακα 7 καθώς και τα γραφήματα 13-17 δείχνουν ότι η σκλαρεόλη έχει δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε και η δράση αυτή διαφέρει ανάλογα την κυτταρική σειρά. Παρατηρείται ότι με το πέρασμα του χρόνου η τοξική της δράση μειώνεται στα φυσιολογικά κύτταρα ενώ αυξάνεται στα νεοπλασματικά. Επίσης φέρει ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στις σαρκωματικές σειρές LMS και U2OS σε σχέση με τις σειρές αδενοκαρκινώματος MCF-7 και HeLa. Ο διαλύτης της ουσίας (DMSO) δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε σε καμία από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.



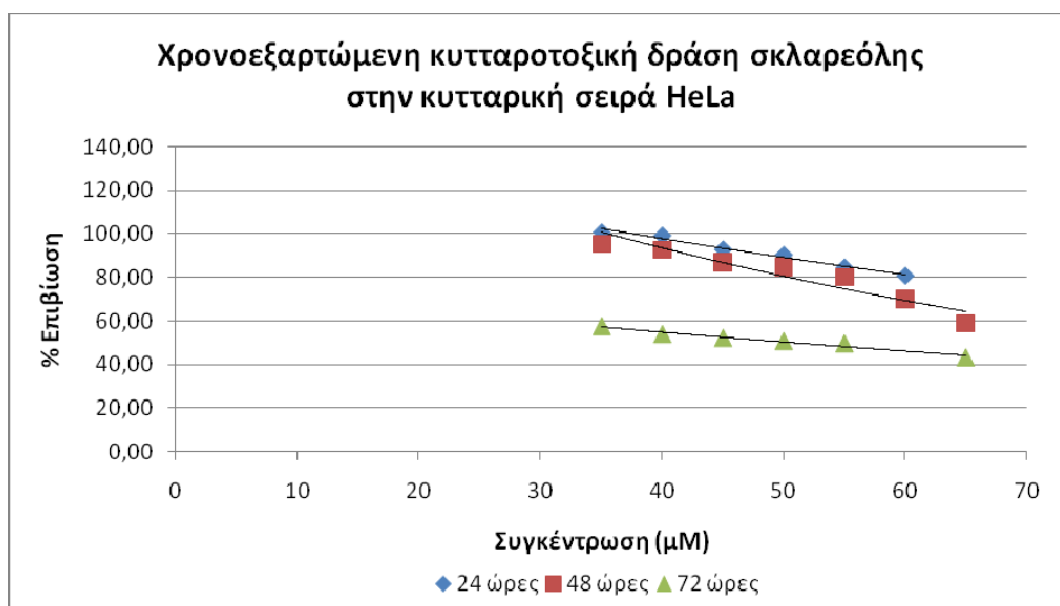
Γράφημα 13. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην σειρά λειομυοσαρκώματος LMS έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ουσίας με τα κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων. Επίσης η κυτταροτοξική δράση της ουσίας αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος επώασης της με τα κύτταρα ($p < 0,05$).



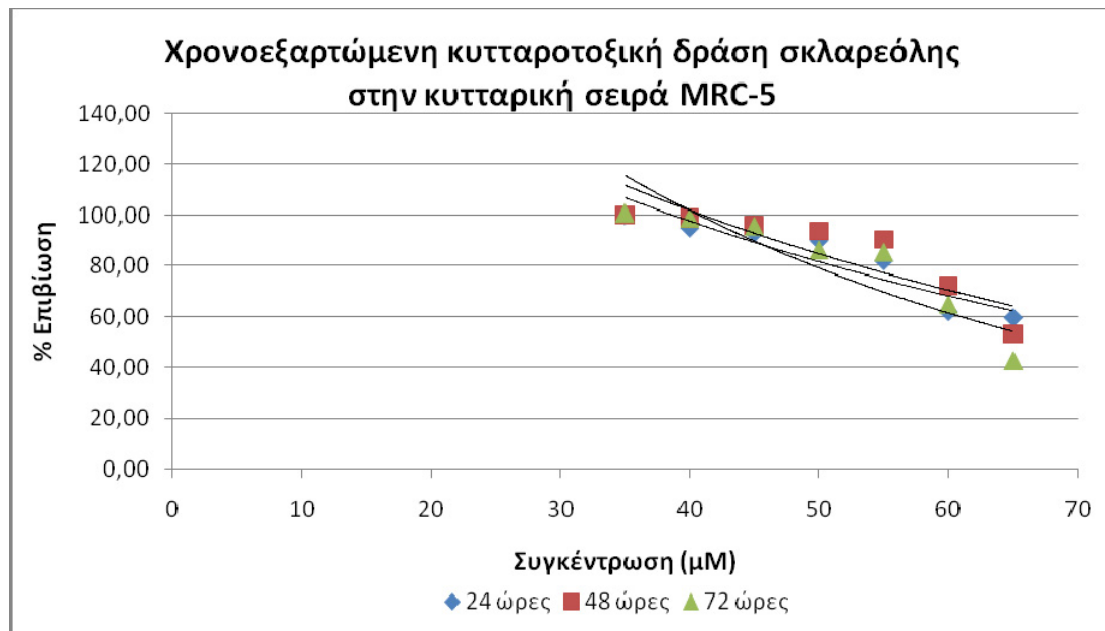
Γράφημα 14. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην καρκινική σειρά του μαστού MCF-7 έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ουσίας με τα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Επίσης



Γράφημα 15. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην σειρά οστεοσαρκώματος U2OS έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ουσίας με τα νεοπλασματικά κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων. Επίσης η κυτταροτοξική δράση της ουσίας αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος επώασης της με τα κύτταρα ($p < 0,05$).



Γράφημα 16. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην καρκινική σειρά του τραχήλου της μήτρας HeLa έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ουσίας με τα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Επίσης η κυτταροτοξική δράση της ουσίας αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος επώασης της με τα καρκινικά κύτταρα ($p < 0,05$).



Γράφημα 17. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην κυτταρική σειρά φυσιολογικών ινοβλαστών MRC-5 έπειτα από 24, 48 και 72 ώρες επώασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων της ουσίας με τα φυσιολογικά κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης, μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των φυσιολογικών κυττάρων. Έπειτα από 24 και 48 ώρες επώασης της σκλαρεόλης με τα κύτταρα δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα της ($p>0,05$), ενώ έπειτα από 72 ώρες επώασης η κυτταροτοξική της δράση είναι ισχυρότερη ($p<0,05$).

Ο διαλύτης της ουσίας (DMSO) δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε σε καμία από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν ($p>0,05$).

Συνοπτικά συμπεραίνονται τα εξής:

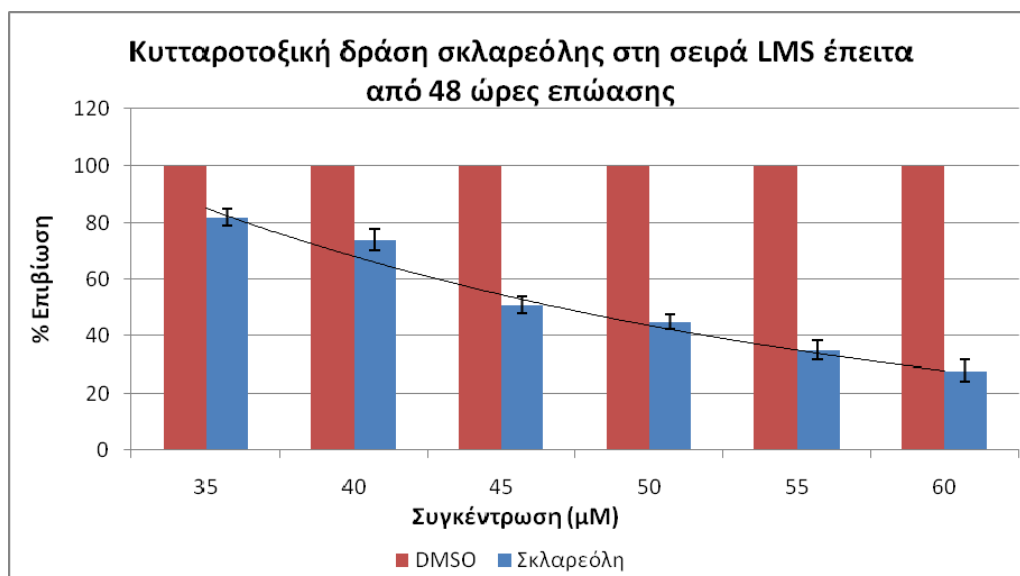
- Η σκλαρεόλη έχει δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε.
- Η κυτταροτοξική της δράση είναι μειωμένη στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 σε σχέση με τα νεοπλασματικά.
- Μεγαλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική ικανότητα παρατηρείται στις σαρκωματικές κυτταρικές σειρές LMS και U2OS σε σχέση με τις αδενοκαρκινωματικές σειρές MCF-7 και HeLa.

3.12 Αποτελέσματα κυτταροτοξικής δράσης της σκλαρεόλης με τη μέθοδο Trypan blue

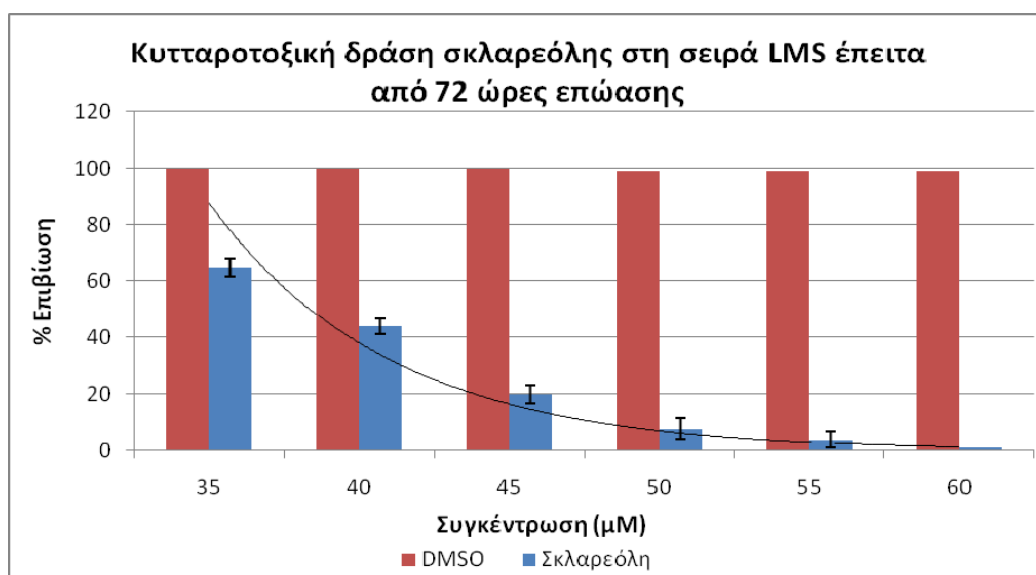
Τα παρακάτω γραφήματα απεικονίζουν την κυτταροτοξική δράση της σκλαρεόλης και του διαλύτη της (DMSO) έπειτα από 48 και 72 ώρες επώασης με τις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7 και MRC-5 αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται, η σκλαρεόλη έχει χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε. Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} που απεικονίζονται στον πίνακα 8, η σκλαρεόλη έχει μικρότερη κυτταροτοξική δράση στην φυσιολογική κυτταρική σειρά ινοβλαστών MRC-5 σε σχέση με τις νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές LMS και MCF-7. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα τις μεθόδου του MTT. Επίσης παρατηρείται ότι οι τιμές IC_{50} της μεθόδου του Trypan blue συμπίπτουν με εκείνες της μεθόδου του MTT και όπως φαίνεται η σκλαρεόλη έχει μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση στην σαρκωματική σειρά LMS σε σχέση με την αδενοκαρκινωματική σειρά MCF-7.

Πίνακας 8. Τιμές IC_{50} έπειτα από 48 και 72 ώρες επώασης της σκλαρεόλης με τις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7 και MRC-5, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Trypan blue

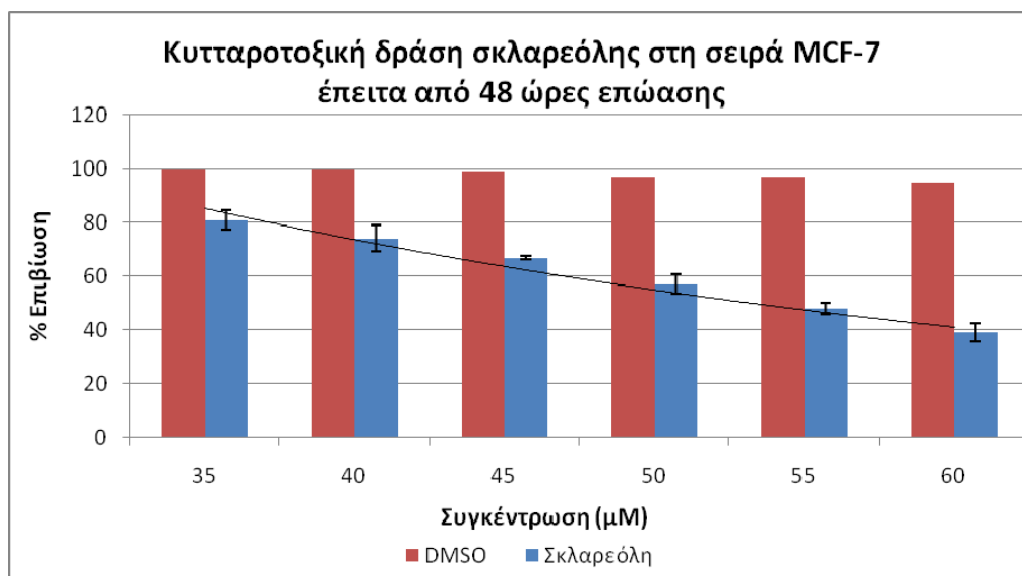
Κυτταρική σειρά Χρόνος επώασης	LMS	MCF-7	MRC-5
48 ώρες	48,59±1,67μM	53,94±2,12μM	69,37±1,81μM
72 ώρες	37,31±1,57μM	47,42±0,58μM	67,84±1,91μM



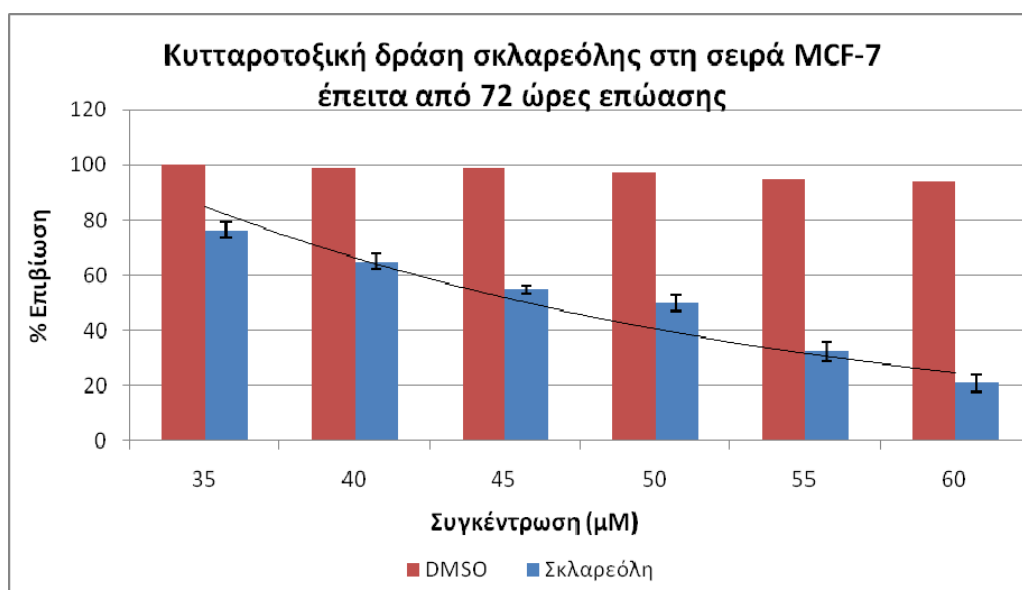
Γράφημα 18. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης και του διαλύτη DMSO στην κυτταρική σειρά LMS έπειτα από 48 ώρες επώασης της ουσίας με τα κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των νεοπλασματικών κυττάρων ($p < 0,05$). Επίσης φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO δεν έχει τοξική δράση στα LMS κύτταρα ($p > 0,05$).



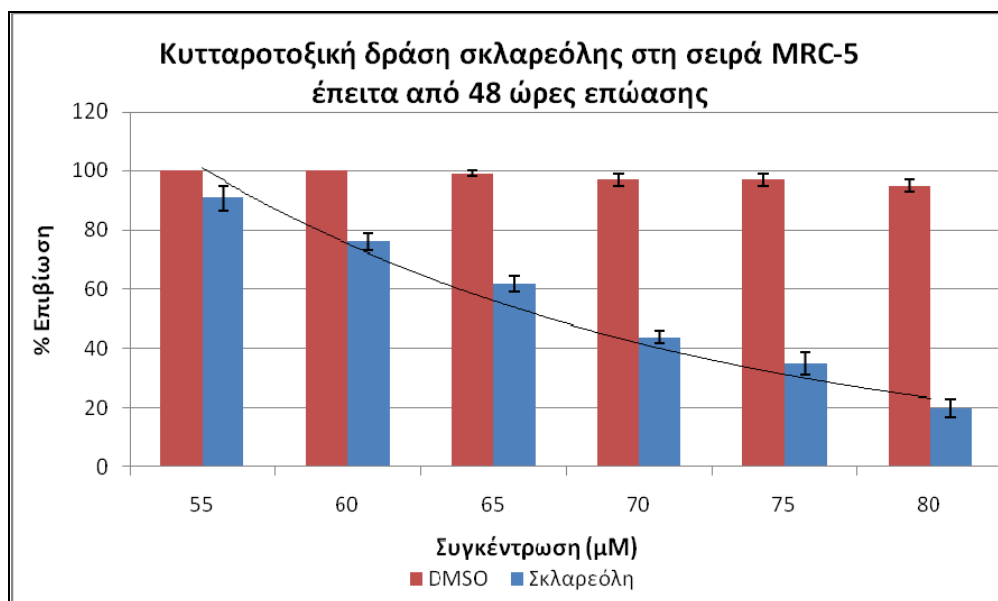
Γράφημα 19. Κυτταροτοξική δράση της σκλαρεόλης και του διαλύτη DMSO στην κυτταρική σειρά LMS έπειτα από 72 ώρες επώασης της. Σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις η δράση της σκλαρεόλης είναι μεγαλύτερη και μειώνει κατά πολύ το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων ($p < 0,05$). Ο διαλύτης δεν έχει κυτταροτοξική δράση ($p > 0,05$).



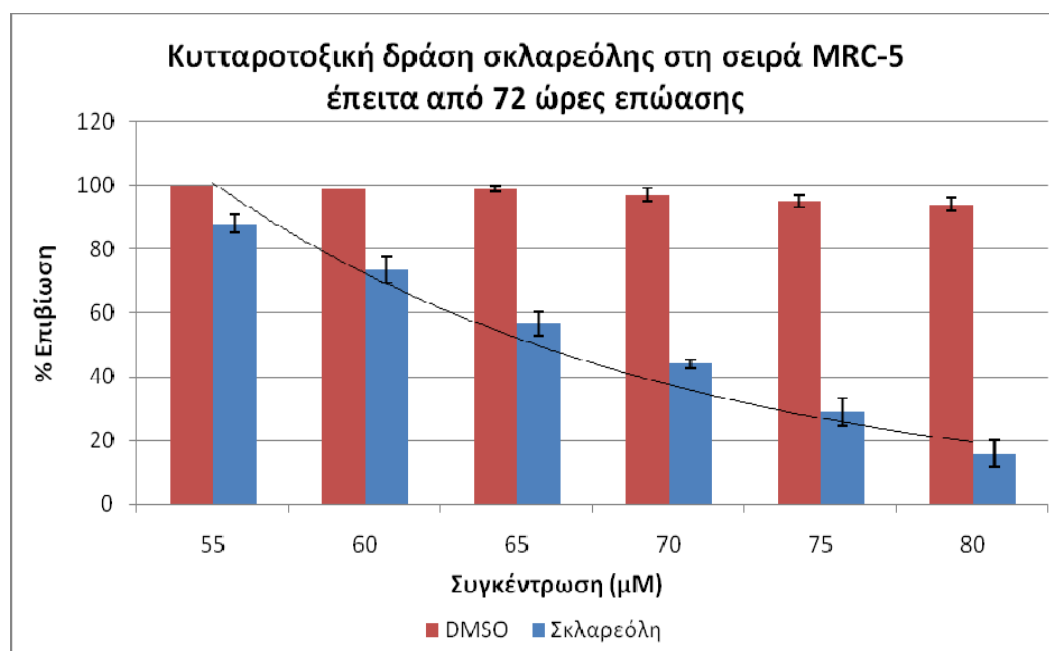
Γράφημα 20. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης και του διαλύτη DMSO στην κυτταρική σειρά MCF-7 έπειτα από 48 ώρες επώασης της ουσίας με τα καρκινικά κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων ($p < 0,05$). Επίσης φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO δεν έχει κυτταροτοξική δράση ($p > 0,05$).



Γράφημα 21. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην καρκινική σειρά MCF-7 έπειτα από 72 ώρες επώασης της με τα κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων ($p < 0,05$). Επίσης παρατηρείται ότι ο διαλύτης δεν έχει τοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα ($p > 0,05$).



Γράφημα 22. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης στην φυσιολογική σειρά ινοβλαστών MRC-5. Παρατηρείται ότι η κυτταροτοξική δράση της σκλαρεόλης αυξάνεται, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ($p < 0,05$). Επίσης ο διαλύτης DMSO δεν επηρεάζει την κυτταροτοξική της δράση ($p > 0,05$).



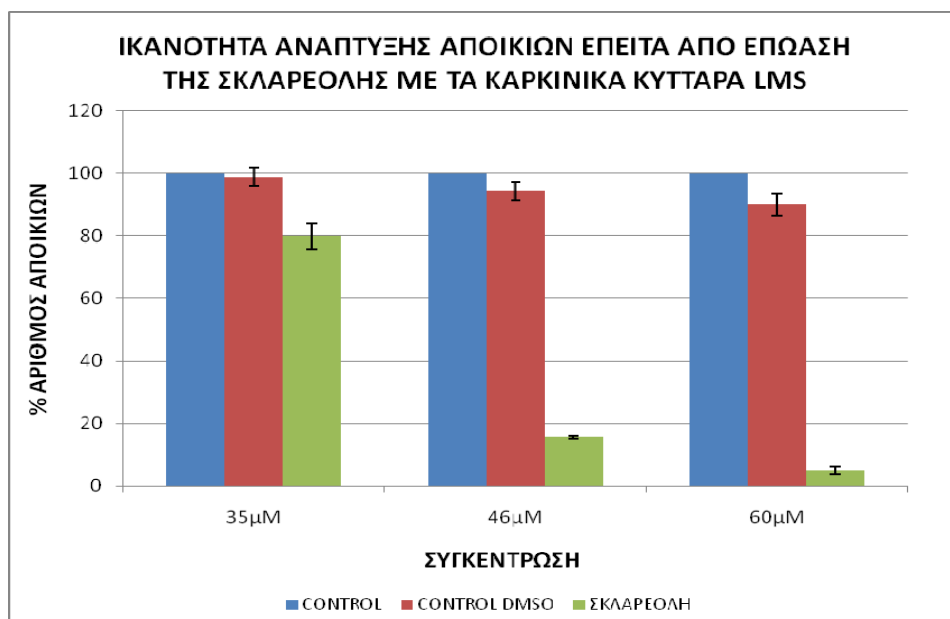
Γράφημα 23. Κυτταροτοξική δράση σκλαρεόλης και του διαλύτη DMSO στην κυτταρική σειρά MRC-5 έπειτα από 72 ώρες επώασης της ουσίας με τα κύτταρα. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σκλαρεόλης μειώνεται το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων ($p < 0,05$). Επίσης φαίνεται ότι ο διαλύτης DMSO δεν έχει τοξική δράση στα κύτταρα ($p > 0,05$).

Συνοπτικά συμπεραίνονται τα εξής:

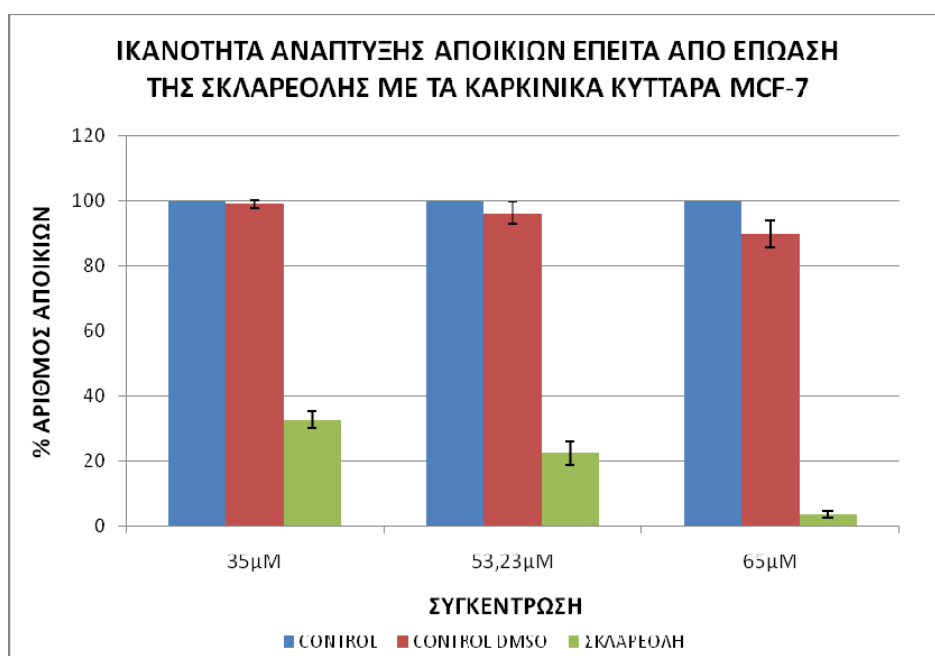
- Η σκλαρεόλη έχει δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε.
- Μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση παρατηρείται στην σαρκωματική κυτταρική σειρά LMS, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα MRC-5 εμφανίζει ασθενέστερη δράση.

3.13 Αποτελέσματα ικανότητας ανάπτυξης αποικιών

Όπως παρατηρείται στα γραφήματα 24 και 25, η σκλαρεόλη προκαλεί μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και η ανασταλτική αυτή δράση δεν οφείλεται στον διαλύτη της (DMSO). Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας παρατηρείται μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση της ουσίας (35μM), η ανασταλτική δράση είναι μεγαλύτερη στην κυτταρική σειρά MCF-7 σε σχέση με την κυτταρική σειρά LMS. Παρόλα αυτά, στην συγκέντρωση της τιμής IC_{50} των δύο κυτταρικών σειρών (46μM για τα LMS κύτταρα και 53,23μM για τα MCF-7 κύτταρα), η ανασταλτική δράση της σκλαρεόλης είναι μεγαλύτερη στην κυτταρική σειρά σαρκώματος LMS σε σχέση με την κυτταρική σειρά αδenoκαρκινώματος MCF-7.



Γράφημα 24. Ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων LMS έπειτα από επώαση με την σκλαρεόλη. Παρατηρείται ότι η σκλαρεόλη προκαλεί μόνιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων και η αναστολή αυτή αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ($p < 0,05$). Ο διαλύτης DMSO επηρεάζει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κατά ένα μικρό ποσοστό ($p > 0,05$).



Γράφημα 25. Ικανότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων MCF-7 έπειτα από επώαση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της σκλαρεόλης. Παρατηρείται ότι η σκλαρεόλη προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού των

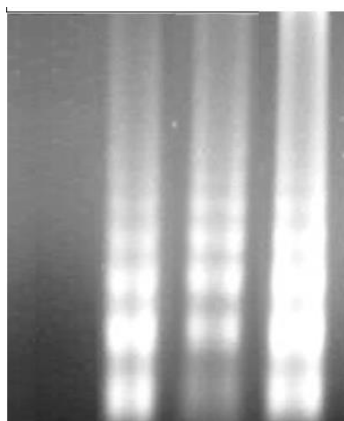
καρκινικών κυττάρων και η αναστολή αυτή είναι μεγαλύτερη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται ($p < 0,05$). Ο διαλύτης DMSO επηρεάζει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων στην μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κατά ένα μικρό ποσοστό ($p > 0,05$).

Συνοψίζοντας:

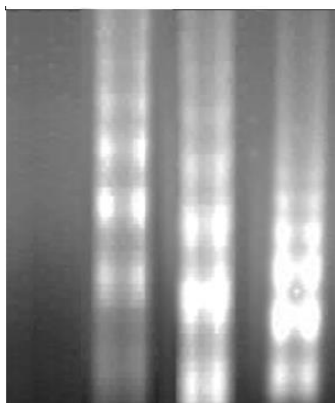
- Η σκλαρεόλη προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων.
- Η αναστολή που προκαλεί η σκλαρεόλη στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της.

3.14 Αποτελέσματα μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

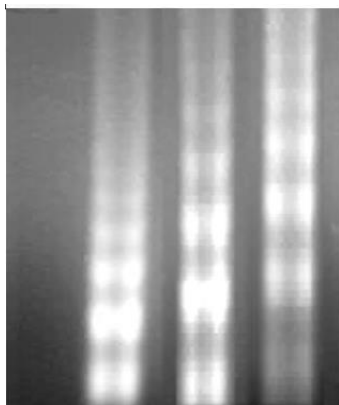
Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης αποκαλύπτει ότι ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί η σκλαρεόλη είναι ο αποπτωτικός (εικόνες 3, 4, 5). Και στις τρεις κυτταρικές σειρές (LMS, MCF-7 και MRC-5) που μελετήθηκε η δράση της σκλαρεόλης, παρατηρούνται εμφανείς ζώνες σε όλες τις συγκεντρώσεις της ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα θραύσματα του DNA έπειτα από τον κατακερματισμό του.



Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση DNA λειομυοσαρκωματικών κυττάρων LMS σε πήκτωμα αγαρόζης, έπειτα από επώαση τους με 0μM, 35μM, 46μM και 60μM σκλαρεόλης (από αριστερά προς δεξιά). Οι ζώνες που εμφανίζονται υποδηλώνουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση DNA καρκινικών κυττάρων MCF-7 σε πήκτωμα αγαρόζης, έπειτα από επώαση τους με 0μM, 35μM, 53,23μM και 65μM σκλαρεόλης (από αριστερά προς δεξιά). Οι ζώνες που εμφανίζονται υποδηλώνουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.



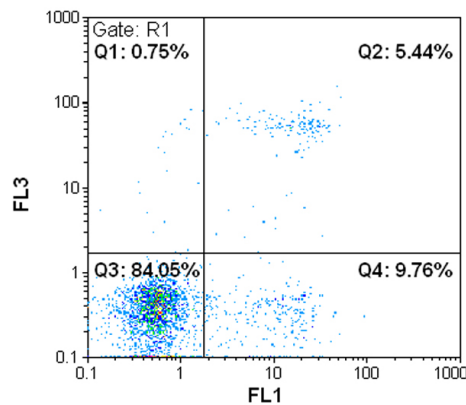
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση DNA φυσιολογικών κυττάρων MRC-5 σε πήκτωμα αγαρόζης, έπειτα από επώαση τους με 0μM, 60μM, 71,3μM και 85μM σκλαρεόλης (από αριστερά προς δεξιά). Οι ζώνες που εμφανίζονται υποδηλώνουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω:

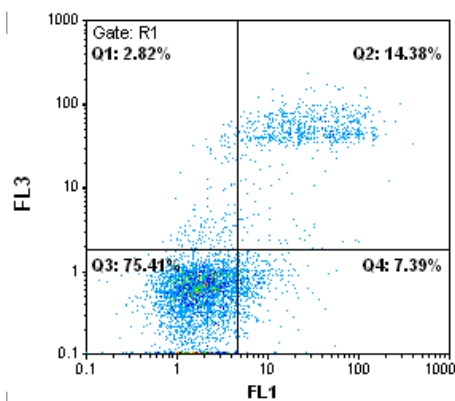
- Η σκλαρεόλη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκε.

3.15 Αποτελέσματα μηχανισμού κυτταρικού θανάτου μέσω κυτταρομετρίας ροής

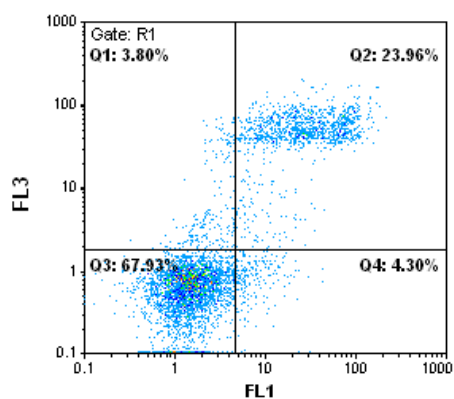
Σύμφωνα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, ο μηχανισμός θανάτου που ακολουθούν τα καρκινικά κύτταρα MCF-7 έπειτα από επώαση τους με τη σκλαρεόλη, είναι ο αποπτωτικός. Παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας, το ποσοστό απόπτωσης είναι μεγαλύτερο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (εικόνες 6-9) ($p < 0,05$). Τα δεδομένα αυτά ταυτίζονται με εκείνα της μεθόδου ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.



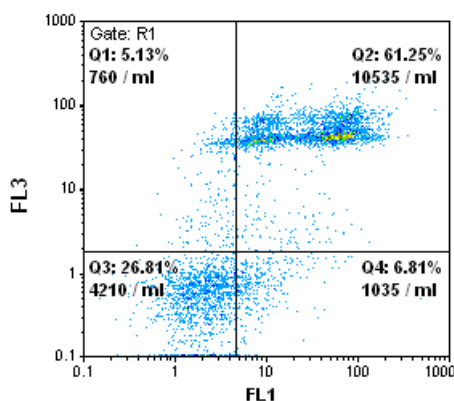
Εικόνα 6. Ομάδα ελέγχου. Καρκινικά κύτταρα MCF-7 τα οποία επώαστηκαν με το θρεπτικό υλικό DMEM. Παρατηρείται 84,05% κυτταρική επιβίωση.



Εικόνα 7. Καρκινικά κύτταρα MCF-7 τα οποία επώαστηκαν με 35μM σκλαρεόλης. Παρατηρείται ότι το 14,38% των κυττάρων ακολουθούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ενώ το 75,41% των κυττάρων επιβιώνει.



Εικόνα 8. Καρκινικά κύτταρα MCF-7 τα οποία επώαστηκαν με 53,23 μM σκλαρεόλης. Παρατηρείται ότι το 23,96% των κυττάρων ακολουθούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ενώ το 67,93% επιβιώνει.



Εικόνα 9. Καρκινικά κύτταρα MCF-7 τα οποία επώαστηκαν με 60 μM σκλαρεόλης. Παρατηρείται ότι το 61,25% των κυττάρων ακολουθούν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ενώ το 26,81% επιβιώνει.

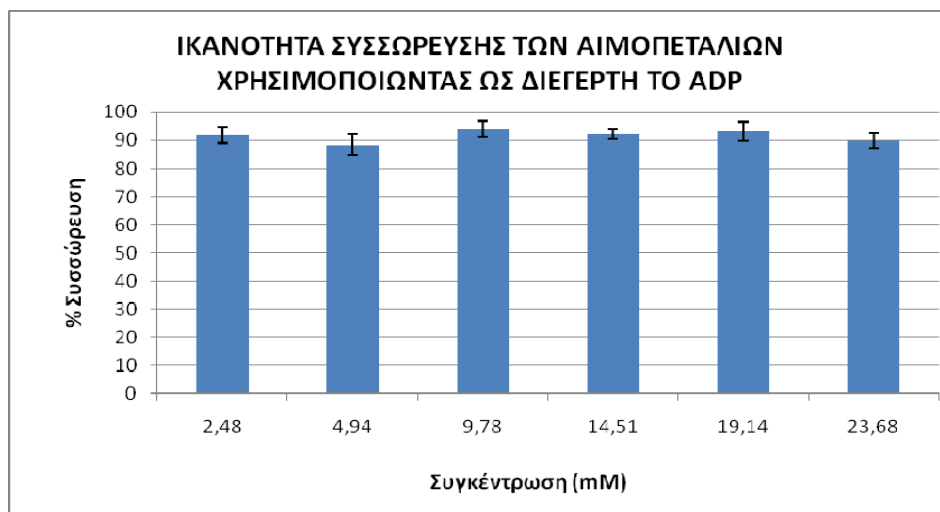
Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι:

- Η σκλαρεόλη προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.
- Το ποσοστό του κυτταρικού θανάτου αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της σκλαρεόλης.

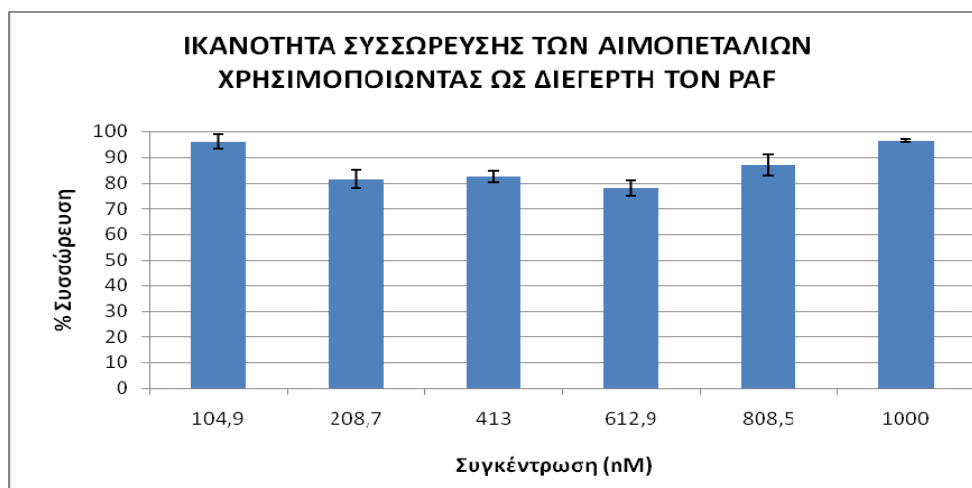
3.16 Αποτελέσματα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Τα αποτελέσματα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των διεγερτών ADP και PAF παρατίθενται στα γραφήματα 26 και 27 αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται, μέγιστη συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλείται στη συγκέντρωση των 9,78 mM για το ADP και στη 120

συγκέντρωση των 104,9nM για τον PAF. Οι δύο αυτές συγκεντρώσεις των διεγερτών χρησιμοποιούνται σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες συσσώρευσης αιμοπεταλίων που περιγράφονται παρακάτω.



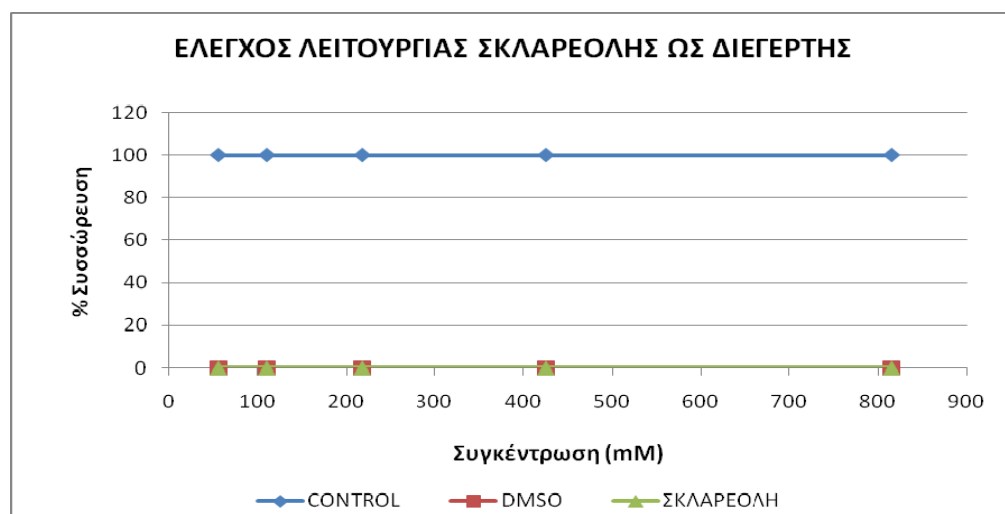
Γράφημα 26. Ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έπειτα από ενεργοποίηση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διεγέρτη ADP. Παρατηρείται ότι στη συγκέντρωση των 9,78mM η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι μεγαλύτερη ($p>0,05$).



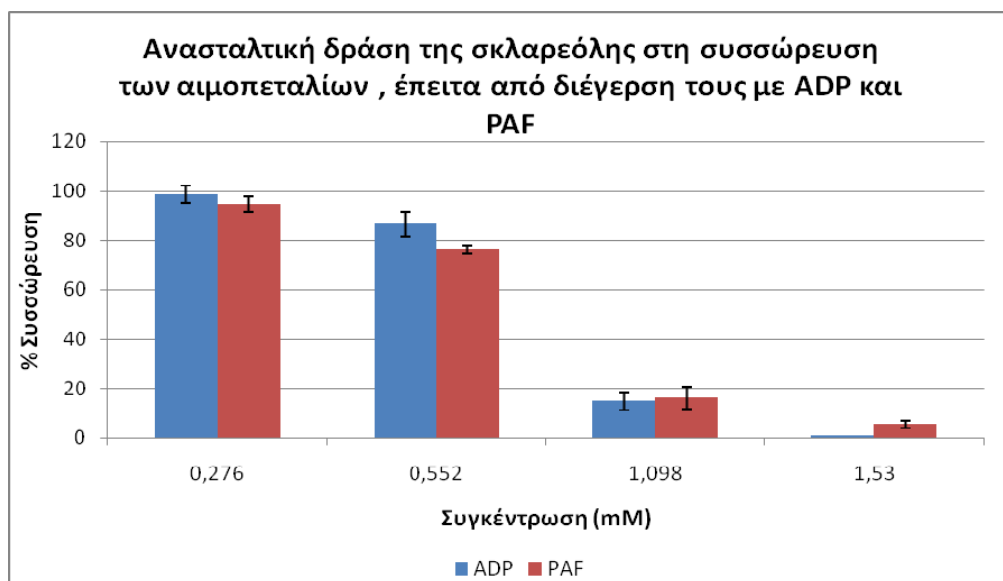
Γράφημα 27. Ικανότητα συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έπειτα από ενεργοποίηση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διεγέρτη PAF. Όπως παρατηρείται, το μεγαλύτερο ποσοστό συσσώρευσης προκαλεί η συγκέντρωση των 104,9nM ($p<0,05$).

Η ικανότητα της σκλαρεόλης να ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια αλλά και να προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης τους, έπειτα από ενεργοποίησή τους με τους διεγέρτες ADP και PAF απεικονίζεται στα γραφήματα 28 και 29. Όπως παρατηρείται,

η σκλαρεόλη και ο διαλύτης της (DMSO) δεν έχουν την ικανότητα να προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε καμία από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Αντιθέτως η σκλαρεόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η οποία αυξάνεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της. Η μεγαλύτερη ανασταλτική δράση που προκαλεί η σκλαρεόλη εμφανίζεται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, έπειτα από διέγερση των αιμοπεταλίων με το διεγέρτη ADP. Ο διαλύτης DMSO δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση σε καμία από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται έπειτα από επώαση της σκλαρεόλης με τα αιμοπετάλια για ένα λεπτό. Σε περίπτωση όπου η σκλαρεόλη επωάζεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με τα αιμοπετάλια, η ανασταλτική της δράση είναι ισχυρότερη.



Γράφημα 28. Ικανότητα της σκλαρεόλης και του διαλύτη DMSO να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια. Όπως παρατηρείται, η σκλαρεόλη και το DMSO δεν έχουν καμία συσσωρευτική ικανότητα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($p > 0,05$).



Γράφημα 29. Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων έπειτα από επώαση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της σκλαρεόλης και ενεργοποίηση τους με τους διεγέρτες ADP και PAF ($p < 0,05$).

Συνοπτικά συμπεραίνουμε ότι:

- Η σκλαρεόλη δεν προκαλεί διέγερση των αιμοπεταλίων.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, έπειτα από ενεργοποίηση τους με τους διεγέρτες ADP και PAF.
- Η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της σκλαρεόλης.

3.17 Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας

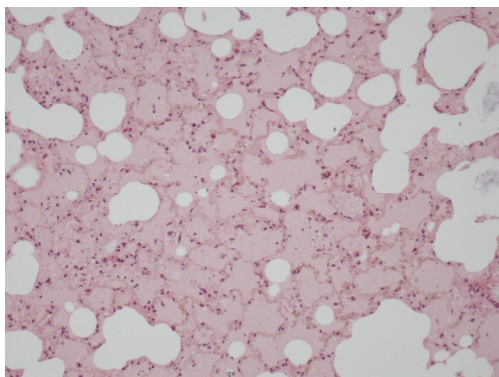
Κατά τη μελέτη της οξείας τοξικότητας χορηγούνται αυξανόμενες συγκεντρώσεις της σκλαρεόλης στα πειραματόζωα ενδοπεριτοναϊκά. Οι ομάδες των πειραματόζωων και οι χορηγούμενες ποσότητες απεικονίζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Ομάδες πειραματόζωων ανά δόση σκλαρεόλης

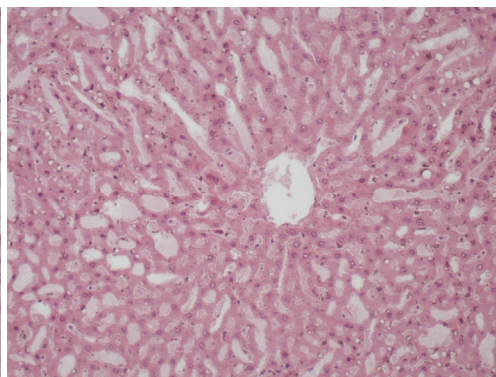
ΟΜΑΔΑ ΖΩΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ	ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΚΛΑΡΕΟΛΗΣ
ΟΜΑΔΑ 1	15	40mg/ kg βάρους
ΟΜΑΔΑ 2	15	120mg/ kg βάρους
ΟΜΑΔΑ 3	15	400mg/ kg βάρους
ΟΜΑΔΑ 4	15	800mg/ kg βάρους
ΟΜΑΔΑ 5	15	1000mg/ kg βάρους
ΟΜΑΔΑ 6	15	Ομάδα ελέγχου

Κανένας θάνατος δεν προκαλείται έπειτα από τη χορήγηση της σκλαρεόλης. Τα πειραματόζωα των ομάδων 1, 2 και 3 δεν παρουσιάζουν καμία μεταβολή στη συμπεριφορά και την κινητικότητα τους, ενώ στα πειραματόζωα των ομάδων 4 και 5 παρατηρείται έντονη δύσπνοια δύο ώρες μετά τη χορήγηση της σκλαρεόλης και μείωση της κινητικότητας τους. Τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση της σκλαρεόλης τα πειραματόζωα έχουν κατασταλεί πλήρως και βρίσκονται σε κατάσταση ακινησίας, ενώ οι καρδιακοί παλμοί και τα αντανακλαστικά τους είναι φυσιολογικά. Η καταστολή διαρκεί τουλάχιστον 12 ώρες, ενώ μετά από 24 ώρες τα πειραματόζωα επανέρχονται πλήρως στην φυσιολογική τους κατάσταση.

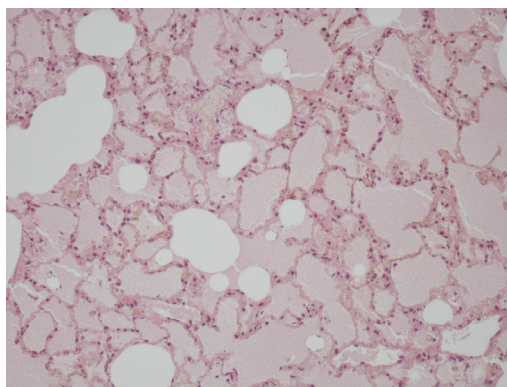
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον παθολογοανατομικό έλεγχο με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, δεν παρουσιάστηκαν αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζωων των ομάδων 1 και 2. Τα πειραματόζωα των ομάδων 3, 4 και 5, τα οποία λάμβαναν τις μεγαλύτερες δόσεις της ουσίας, παρουσίασαν πνευμονικό οίδημα. Ενδεικτικές εικόνες από τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3

Εικόνα 1. (Ομάδα 3, 400mg/kg) Μικροσκοπικά, απεικονίζεται πνεύμονας με πνευμονικό οίδημα (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 2. (Ομάδα 5, 1000mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 3. (Ομάδα 5, 1000mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα πνεύμονα με πνευμονικό οίδημα (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνονται τα εξής:

- Η σκλαρεόλη δεν προκαλεί κανένα θάνατο στα πειραματόζωα έπειτα από χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων της.
- Η χορήγηση συγκεντρώσεων σκλαρεόλης άνω των 400mg/kg προκαλεί πνευμονικό οίδημα στα πειραματόζωα.
- Η χορήγηση άνω των 800mg/kg σκλαρεόλης προκαλεί μείωση της κινητικότητας και έντονη δύσπνοια στα πειραματόζωα.

3.18 Αποτελέσματα χρόνιας τοξικότητας

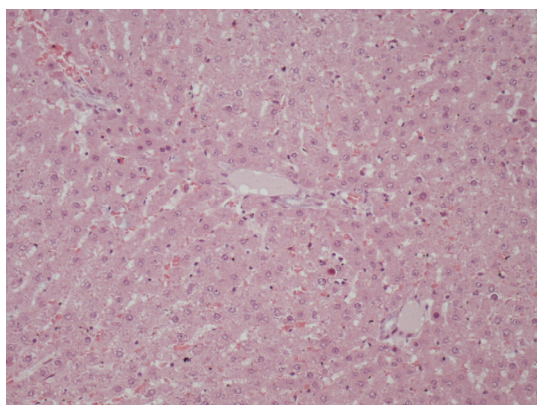
Κατά τη μελέτη της χρόνιας τοξικότητας χορηγούνται διαφορετικές ποσότητες της σκλαρεόλης ανά ομάδα πειραματόζωων ενδοπεριτοναϊκά 2 φορές την εβδομάδα για τέσσερις εβδομάδες. Οι ομάδες των ζώων και οι χορηγούμενες ποσότητες απεικονίζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Ομάδες πειραματόζωων ανά χορηγούμενη δόση σκλαρεόλης

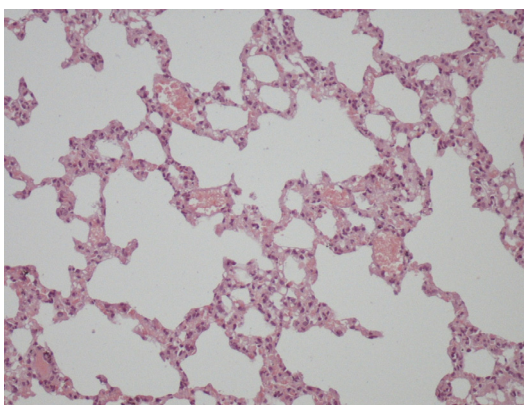
ΟΜΑΔΑ ΖΩΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ	ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΚΛΑΡΕΟΛΗΣ ΑΝΑ ΔΟΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΚΛΑΡΕΟΛΗΣ
ΟΜΑΔΑ 1	15	18,73mg/kg βάρους	149,84mg/kg
ΟΜΑΔΑ 2	15	100mg/kg βάρους	800mg/kg
ΟΜΑΔΑ 3	15	500mg/kg βάρους	4000mg/kg
ΟΜΑΔΑ 4	15	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα ελέγχου

Τα πειραματόζωα των ομάδων 1 και 2 δεν παρουσιάζουν καμία μεταβολή στη συμπεριφορά και την κινητικότητα τους έπειτα από το χορήγηση της σκλαρεόλης. Κάποια ζώα της ομάδας 3 καταστέλλονται μετά από δύο ώρες από την 5^η χορήγηση της μεγάλης δόσης, τα οποία την επόμενη μέρα επανέρχονται πλήρως στην φυσιολογική τους κατάσταση. Επίσης επήλθε θάνατος σε ένα πειραματόζωο της ομάδας 3 κατά την 7^η χορήγηση της μεγάλης δόσης, ενώ τα υπόλοιπα πειραματόζωα επιζούν έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

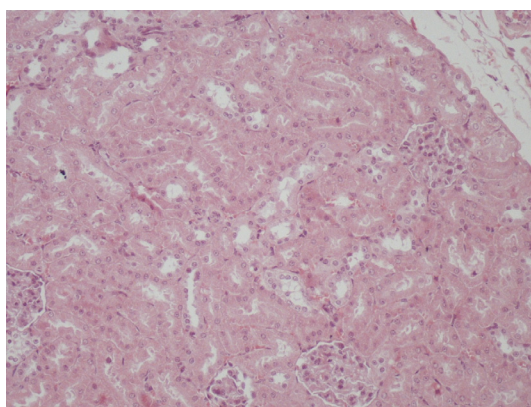
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, δεν παρουσιάστηκαν αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζωων στις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω ορισμένες εικόνες από τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο.



Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3

Εικόνα 1. (Ομάδα 1, 149,84mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού ηπατικού παρεγχύματος (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 2. (Ομάδα 2, 800mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού πνεύμονα (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 3. (Ομάδα 3, 4000mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα νεφρικού παρεγχύματος χωρίς αλλοιώσεις (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Συνοψίζοντας:

- Η χορήγηση συνολικά μεγάλων ποσοτήτων της σκλαρεόλης δεν επιφέρει θάνατο στα πειραματόζωα.
- Το LD₅₀ της είναι μεγαλύτερο από 5g/kg.
- Η χορήγηση συνολικά μεγάλων συγκεντρώσεων σκλαρεόλης δεν προκαλεί βλάβη στα όργανα των πειραματόζωων.

3.19 Αποτελέσματα καρκινογένεσης μέσω ενοφθαλμισμού καρκινικών κυττάρων σε επίμυες Wistar- έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης της σκλαρεόλης

Τα πειραματόζωα που ανέπτυξαν όγκους χωρίζονται σε τρεις ομάδες (πίνακας 11). Οι δύο ομάδες αποτελούν τις ομάδες θεραπείας, στις οποίες χορηγείται συγκεκριμένη ποσότητα σκλαρεόλης δύο φορές την εβδομάδα ενώ η τρίτη ομάδα αποτελεί την ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγείται ο διαλύτης της σκλαρεόλης, η τρικαπριλίνη.

Πίνακας 11. Ομάδες πειραματόζωων ανά χορηγούμενη ποσότητα σκλαρεόλης.

ΟΜΑΔΕΣ ΖΩΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ	ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΚΛΑΡΕΟΛΗΣ ΑΝΑ ΔΟΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΣΚΛΑΡΕΟΛΗΣ
ΟΜΑΔΑ 1	15	100mg/kg	800mg/kg
ΟΜΑΔΑ 2	15	330mg/kg	2.640mg/kg
ΟΜΑΔΑ 3	15	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα ελέγχου

Κατά την διάρκεια της πειραματικής πορείας τα πειραματόζωα της δεύτερης ομάδας θεραπείας είναι περισσότερο κινητικά σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Η πρόσληψη τροφής και η αποβολή κοπράνων είναι φυσιολογική και σταθερή σε όλες τις ομάδες των πειραματόζωων. Η πρόσληψη νερού και η αποβολή ούρων είναι φυσιολογική στην ομάδα ελέγχου και την πρώτη ομάδα θεραπείας, ενώ στην δεύτερη ομάδα θεραπείας παρατηρείται στατιστικά σημαντική αυξημένη πρόσληψη νερού κατά 42% και αυξημένη αποβολή ούρων κατά 98% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον παρατηρείται καθημερινή αύξηση του βάρους του σώματος των ζώων όλων των ομάδων κατά 7 περίπου γραμμάρια.

Μετά τον θάνατο των πειραματόζωων, υπολογίζεται ο μέσος χρόνος ζωής τους, η παράταση του χρόνου ζωής τους, T/C% (median survival time of treated rats/median survival time of control %), η επί τοις εκατό αναστολή της αύξηση του βάρους του όγκου τους, TWI% (tumor weight inhibition %), το μέσο βάρος του

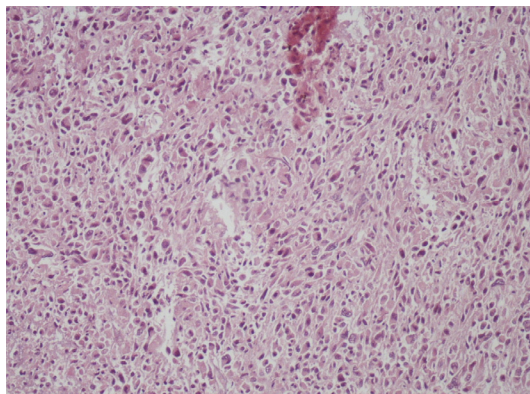
όγκου, MTW (median tumor weight) και ο μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου, MTGR (median tumor growth rate) (πίνακας 12).

Όπως φαίνεται στον πίνακα 12, ο ρυθμός αύξησης του βάρους του όγκου καθώς και το μέσο βάρος του είναι μεγαλύτερος στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τις δύο ομάδες θεραπείας. Ο μέσος χρόνος ζωής των πειραματόζωων των ομάδων θεραπείας είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στην οποία δεν χορηγούνταν η σκλαρεόλη. Μετά την 15^η ημέρα από την έναρξη της χορήγησης της ουσίας παρατηρούνται θάνατοι των πειραματόζωων της ομάδας ελέγχου ενώ από την 20^η ημέρα μέχρι την 23^η παρατηρούνται μαζικοί θάνατοι στην πρώτη ομάδας θεραπείας. Μέχρι το τέλος της πειραματικής πορείας κατάφερε να επιζήσει περίπου το 50% των πειραματόζωων της δεύτερης ομάδας θεραπείας. Παρόλο που τα πειραματόζωα της δεύτερης ομάδας θεραπείας επέζησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (ποσοστό παράτασης του χρόνου επιβίωσης T/C 35%, $p=0,05$), μεγαλύτερη αναστολή στην ανάπτυξη του όγκου παρατηρείται στην πρώτη ομάδα θεραπείας, η οποία λάμβανε την μικρότερη ποσότητα της σκλαρεόλης.

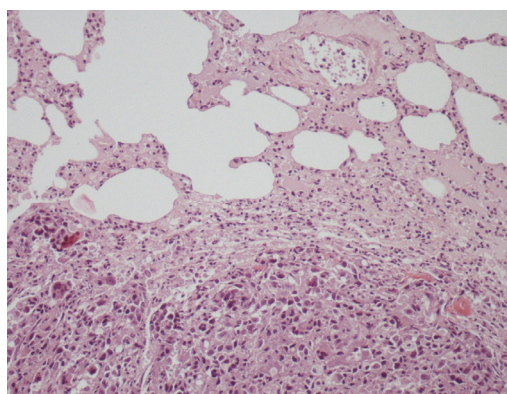
Πίνακας 12. Μέσος χρόνος ζωής των πειραματόζωων ανά ομάδα (σε ημέρες), παράταση του χρόνου ζωής ανά ομάδα, T/C% (median survival time of treated rats/median survival time of control %), επί τοις εκατό αναστολή της αύξηση του βάρους του όγκου ανά ομάδα, TWI% (tumor weight inhibition %), μέσο βάρος του όγκου ανά ομάδα, MTW (median tumor weight) και μέσος ρυθμός ανάπτυξης του όγκου ανά ομάδα, MTGR (median tumor growth rate), όπου $TGR (g/d) = \frac{\text{Βάρος όγκου (g)}}{\text{ημέρες επιβίωσης (d)}}$ ($p \geq 0,05$).

Παράμετροι Ομάδες Ζώων	Μέσος χρόνος ζωής (ημέρες)	T/C%	TWI%	MTW (g)	MTGR (g)
Ομάδα 1	22±2	110%	16%	63,8±3,4g	2,9±1,7g
Ομάδα 2	27±5	135%	9%	69±4,7g	2,55±0,94g
Ομάδα ελέγχου	20±3	100%	0%	74,6±4,3g	3,73±1,43g

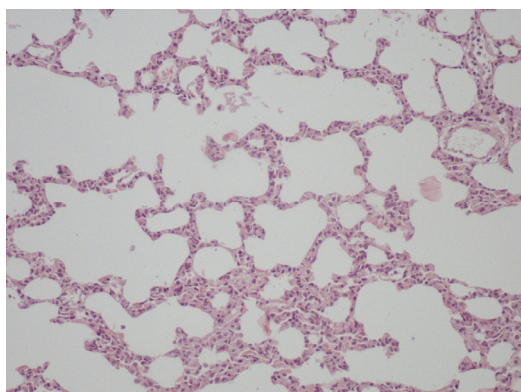
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, δεν παρουσιάστηκαν αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζων στις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ το 25% των πειραματόζων της ομάδας ελέγχου εμφάνισε μεταστάσεις στον πνεύμονα. Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω ορισμένες εικόνες από τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο, καθώς και των πειραματόζων με ανάπτυξη όγκου.



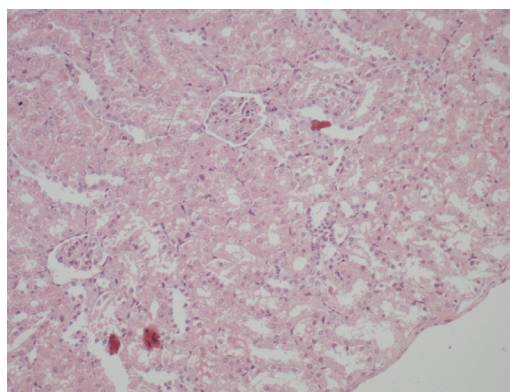
Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3



Εικόνα 4

Εικόνα 1. (Ομάδα ελέγχου) Μικροσκοπική εικόνα βιοψίας όγκου (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 2. (Ομάδα ελέγχου) Μικροσκοπική εικόνα πνεύμονα με μετάσταση (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 3. (Ομάδα θεραπείας 2, 2640mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού πνεύμονα (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Εικόνα 4. (Ομάδα θεραπείας 2, 2640mg/kg) Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού νεφρικού παρεγχύματος (Αιματοξυλίνη-ηωσίνη X 200).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω συμπεραίνουμε ότι:

- Η χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων σκλαρεόλης προκαλεί αύξηση στην πρόσληψη νερού και την αποβολή ούρων.
- Ο μέσος χρόνος ζωής των πειραματόζων των ομάδων θεραπείας είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
- Μέχρι το τέλος της πειραματικής πορείας επιζεί περίπου το 50% των πειραματόζων της δεύτερης ομάδας θεραπείας.
- Μεγαλύτερη αναστολή στην ανάπτυξη του όγκου παρατηρείται στην πρώτη ομάδα θεραπείας.
- Η σκλαρεόλη δεν προκαλεί βλάβη στα όργανα των πειραματόζων σε καμία από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.
- Το 25% των πειραματόζων της ομάδας ελέγχου εμφάνισε μετάσταση στον πνεύμονα.

Φωτογραφικό υλικό

Φωτογραφία 1. Πειραματόζωο ομάδας ελέγχου με ανάπτυξη σαρκωματικού όγκου.



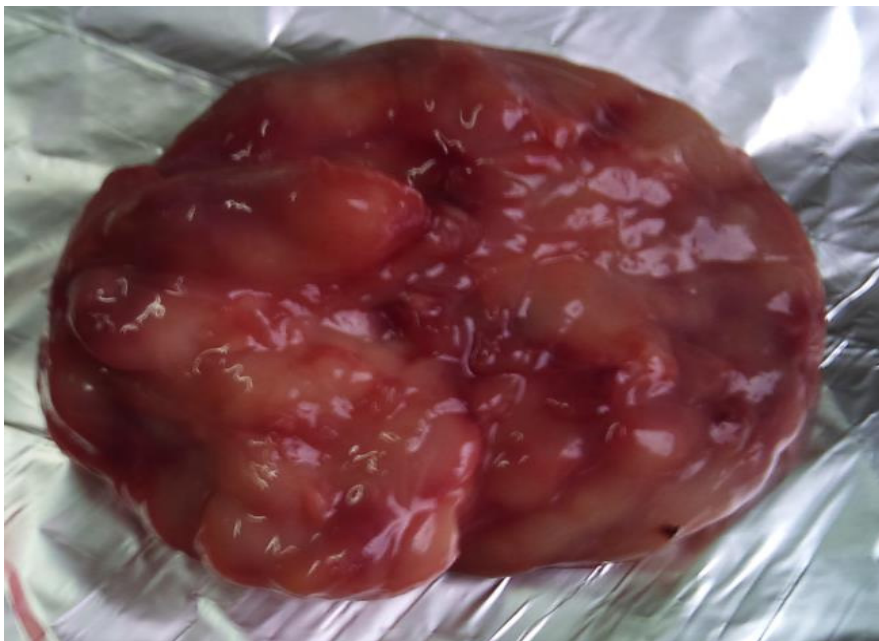
Φωτογραφία 2. Πειραματόζωο ομάδας ελέγχου με ανάπτυξη σαρκωματικού όγκου



Φωτογραφία 3. Πειραματόζωο ομάδας θεραπείας με ανάπτυξη σαρκοματικού όγκου.



Φωτογραφία 4. Απομονωμένο περίβλημα όγκου από πειραματόζωο.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρόλο που οι θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού *Viscum album* είναι γνωστές εδώ και αιώνες και η χρήση του στη θεραπεία του καρκίνου είναι ευρεία εδώ και μερικές δεκαετίες, λίγες μελέτες έχουν γίνει για τα χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά του, καθώς οι ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στις λεκτίνες και στις βισκοτοξίνες του φυτού (Giudici et al., 2003, Wacker et al, 2004, Pryme et al. 2006, Stirpe et al., 1982, Coulon et al., 2003, Tabiasco et al., 2002).

Στη παρούσα μελέτη, το φυτό συλλέχθηκε από συγκεκριμένη περιοχή κατά τη διάρκεια δύο διαφορετικών εποχών συγκομιδής, της χειμερινής περιόδου (Δεκέμβριος-Ιανουάριος) και της καλοκαιρινής περιόδου (Ιούνιος-Ιούλιος) και τα φύλλα του κατεργαστήκαν με τις ίδιες πειραματικές διεργασίες. Τέσσερα λιπιδιακά κλάσματα για κάθε εποχή προέκυψαν από την κατεργασία του φυτού, το χλωροφορμικό (κλάσμα 1), το οποίο περιέχει όλα τα λιπιδιακά συστατικά του φυτού, το υδατομεθανολικό (κλάσμα 2), το οποίο περιέχει τα περισσότερα πολικά συστατικά του φυτού, το αιθανολικό (κλάσμα 3), το οποίο περιέχει τα πολικά λιπίδια και το αιθερικό (κλάσμα 4), το οποίο περιέχει τα ουδέτερα-μη πολικά λιπιδιακά συστατικά. Η κυτταροτοξική δράση των κλασμάτων αυτών στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7 διαφέρει ανά εποχή, αλλά η σειρά δραστηρότητας τους είναι η ίδια και για τις δύο εποχές, με το υδρόφοβο κλάσμα 4 να έχει την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων MCF-7 κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών. Ακολουθεί το κλάσμα 3 (αιθανολικό), ενώ το κλάσμα 1 (χλωροφορμικό) καθώς και το κλάσμα 2 (υδατομεθανολικό) έχουν κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επίσης, τα κλάσματα αυτά όπως φαίνεται έχουν μειωμένη κυτταροτοξική δράση στους φυσιολογικούς ινοβλάστες, με το κλάσμα 4 να φέρει την ισχυρότερη δράση κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών του έτους.

Συνεχίζοντας τη μελέτη μας με το υδρόφοβο κλάσμα 4 (αιθερικό), η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) αποκάλυψε την ύπαρξη έξι ζωνών για το καλοκαιρινό και οχτώ για το χειμερινό κλάσμα. Φαίνεται ότι τα λιπιδιακά συστατικά IVb και VIb απουσιάζουν κατά την καλοκαιρινή περίοδο. Η απουσία αυτών των δύο λιπιδιακών συστατικών, καθώς και το γεγονός ότι κατά τη χειμερινή περίοδο οι

συγκεντρώσεις των λιπιδίων είναι κατά πολύ αυξημένες σε σχέση με εκείνες των καλοκαιρινών σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, δείχνουν ότι η εποχή συγκομιδής παίζει σημαντικό ρόλο στην κατανομή και τη συγκέντρωση των συστατικών του φυτού. Επίσης παρατηρείται αυξημένη κυτταροτοξική δράση των λιπιδίων στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 (εκτός από το λιπίδιο VIIIb) και μειωμένη στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 κατά τη χειμερινή εποχή συγκομιδής (εκτός από το λιπίδιο IVb) σε σχέση με εκείνα της καλοκαιρινής περιόδου, όπου σύμφωνα με τη μελέτη μας η κυτταροτοξική δράση στα φυσιολογικά κύτταρα είναι αρκετά αυξημένη και σε ορισμένες περιπτώσεις ίση ή και μεγαλύτερη από αυτή των καρκινικών κυττάρων (λιπίδια III, V, VI). Τα δεδομένα αυτά αποκαλύπτουν ότι η εποχή συγκομιδής έχει ουσιώδη σημασία για τη σύσταση και την κυτταροτοξική δράση των λιπιδιακών συστατικών που απομονώθηκαν σε αυτήν την μελέτη και συμφωνούν με τις θεωρίες που ισχυρίζονται ότι οι βιολογικές δράσεις του *Viscum album* επηρεάζονται από την εποχή συγκομιδής του (Bar-Sela, 2011, Onay-Ucar et al., 2006). Έχει ήδη αποδειχθεί ότι υπάρχει ανισοκατανομή των ουσιών του φυτού και το Δεκέμβριο η περιεκτικότητα των λεκτινών του *Viscum album* φτάνει στο μέγιστο, ενώ η παρουσία των βισκοτοξινών είναι αυξημένη τον Ιούνιο (Urech et al., 2013).

Γενικά είναι γνωστό ότι οι εποχικές διακυμάνσεις επηρεάζουν τη σύσταση των συστατικών των φυτών (Lakusic' et al., 2012, Kashoury et al., 2012) όπως στην περίπτωση του φαρμακευτικού φυτού *Shorea robusta* Gaertn (oleoresin) όπου την περίοδο Απριλίου-Μαρτίου η περιεκτικότητα των ενεργών συστατικών του (ταννίνες, φαινολικά συστατικά, πολικά συστατικά) είναι αυξημένη σε σχέση με τους χειμερινούς μήνες Δεκέμβριο-Ιανουάριο (Poornima, 2009). Επίσης η περιεκτικότητα των φαινολών του φυτού *Cydonia oblonga* μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή συγκομιδής και παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων της quercetin-3-Ogalactoside και kaempferol-3-O-glucoside, κάτι το οποίο σχετίζεται με την υψηλή θερμοκρασία και τους μηχανισμούς απόκρισης του φυτού στη ζέστη κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Oliveira et al., 2007). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το φυτό *Betula alleghaniensis* όπου η συγκέντρωση των συστατικών του λιπόφιλου εκχυλίσματος του μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή συγκομιδής (Lavoie et al., 2005).

Το λιπιδιακό συστατικό με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα MCF-7 και την ασθενέστερη στους φυσιολογικούς ινοβλάστες

που απομονώθηκε στην παρούσα εργασία είναι το Vb της χειμερινής περιόδου, το οποίο προέρχεται από το υδρόφοβο κλάσμα 4 του φυτού. Το ουδέτερο λιπίδιο Vb όπως αποδείχθηκε, προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης.

Η ταυτοποίηση του λιπιδιακού συστατικού Vb χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Υψηλής Ανάλυσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-HPLC) και την τεχνική της Φασματοσκοπίας Μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS), οδήγησαν στον χαρακτηρισμό του ως διτερπένιο, δομικά ανάλογο της σκλαρεόλης. Η σκλαρεόλη είναι ένα λαβδανικό διτερπένιο που χρησιμοποιείται ευρέως από τις βιομηχανίες τροφίμων και αρωμάτων καθώς προσδίδει ιδιαίτερη γεύση και άρωμα αντίστοιχα και υπάρχει σε αφθονία στη φύση.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης της σκλαρεόλης στις κυτταρικές σειρές LMS (λειομυοσάρκωμα), MCF-7 (καρκίνος του μαστού), U2OS (οστεοσάρκωμα), HeLa (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας) και MRC-5 (φυσιολογικοί ινοβλάστες) έδειξε ότι η σκλαρεόλη εμφανίζει δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση και τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με μελέτες που έχουν γίνει σε άλλες κυτταρικές σειρές (Mahaira et al., 2011). Ανάλογα με το χρόνο επώασης της σκλαρεόλης με τα καρκινικά κύτταρα, παρατηρείται ότι ισχυρότερη δράση εμφανίζει στην κυτταρική σειρά U2OS, με τιμή IC_{50} $51 \pm 0,12 \mu M$ κατά τη διάρκεια των 24 ωρών επώασης και $44,6 \pm 0,31 \mu M$ κατά τη διάρκεια των 48 ωρών επώασης, ενώ κατά τη διάρκεια των 72 ωρών επώασης η σκλαρεόλη έχει ισχυρότερη αντικαρκινική δράση στην κυτταρική σειρά LMS (IC_{50} $38,8 \pm 0,6 \mu M$). Ακολουθούν οι κυτταρικές σειρές MCF-7 και HeLa ενώ στους φυσιολογικούς ινοβλάστες το διτερπένιο έχει την ασθενέστερη κυτταροτοξική δράση έπειτα από 72 ώρες επώασης. Όπως παρατηρείται η κυτταροτοξική δράση της σκλαρεόλης είναι μεγαλύτερη στις σαρκοματικές κυτταρικές σειρές LMS και U2OS. Τα δεδομένα αυτά επαληθεύονται και από τις δύο τεχνικές μελέτης της κυτταροτοξικότητας (MTT και Trypan blue).

Από τα δεδομένα της παρούσας διατριβής φαίνεται ότι η σκλαρεόλη προκαλεί μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού η οποία αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της. Επίσης, τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα ακολουθούν τον μηχανισμό της απόπτωσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης και το ποσοστό του κυτταρικού

θανάτου που επέρχεται αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της σύμφωνα με τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής. Τα δεδομένα αυτά ταυτίζονται με μελέτες που έχουν γίνει σε άλλες κυτταρικές σειρές (Hatziantoniou et al., 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι ο αποπτωτικός θάνατος που προκαλεί η σκλαρεόλη σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 9 και αργότερα της κασπάσης 3, που έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση του PARP (Dimas et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η απόπτωση ενεργοποιείται μέσω και των δύο μονοπατιών ενεργοποίησης της, του υποδοχέα θανάτου και της μιτοχονδριακής πορείας.

Άλλες μελέτες δείχνουν πως η σκλαρεόλη παρεμβαίνει στον κυτταρικό κύκλο και προκαλεί συσσώρευση των καρκινικών κυττάρων στην φάση G0/1 σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Επίσης προκαλεί αναστολή της σύνθεσης του DNA στα καρκινικά κύτταρα με χρονοεξαρτώμενο και δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Dimas et al., 1999). Η κυτταροτοξική της δράση και η αναστολή που προκαλεί στον κυτταρικό κύκλο είναι ανεξάρτητα της έκφρασης του γονιδίου p53, καθώς φέρει τις ίδιες αντικαρκινικές ιδιότητες σε κύτταρα που εκφράζουν και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν το γονίδιο αυτό. (Dimas et al., 2006). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο p53, ενεργοποιείται όταν το κύτταρο έχει υποστεί βλάβη και αναστέλλει τον κυτταρικό του κύκλο έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη ειδάλλως το οδηγεί στην απόπτωση. Επίσης ρυθμίζει αρνητικά την μεταγραφή των γονιδίων που καταστέλλουν την απόπτωση, όπως το γονίδιο Bcl-2, καθώς και το γονίδιο MDR-1, το οποίο φέρει τον φαινότυπο πολλαπλής αντίστασης. Διάφοροι τύποι νεοπλασματικών κυττάρων υφίστανται μεταλλάξεις στο γονίδιο p53, γεγονός που τα οδηγεί στην έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου, το οποίο προωθεί την επιβίωση και την ογκογένεση μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων τα οποία δεν ενεργοποιούνται από το φυσιολογικού τύπου γονίδιο p53, όπως το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF, το γονίδιο c-Myc, Fos και MDR-1. Επιπλέον ποικίλες κακοήθειες που δεν εκφράζουν το φυσιολογικού τύπου γονίδιο p53, γίνονται ανθεκτικές σε πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η βινμπλαστίνη, το ετοποσίδιο και η ταξόλη, λόγω της υπερέκφρασης του γονιδίου MDR-1 (Mirzayans et al., 2012). Η σκλαρεόλη, λόγω της ανεξάρτητης δράσης της από την έκφραση του γονιδίου p53, καθίσταται κατάλληλη ως αντικαρκινικός παράγοντας. Επιπλέον έχει την δυνατότητα να ενισχύει την αντικαρκινική δράση των

χημειοθεραπευτικών φαρμάκων δοξορουβικίνη και ετοποσίδιο με τρόπο επίσης ανεξάρτητο της έκφρασης του γονιδίου αυτού (Dimas et al., 2006).

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η σκλαρεόλη προκαλεί μειορύθμιση του πρωτοογκογονιδίου *c-myc* χωρίς να επηρεάζεται η έκφραση του γονιδίου *Bcl2* στα λευχαιμικά κύτταρα H33AJ-JA (Dimas et al., 2001). Το πρωτοογκογονίδιο αυτό, παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την ογκογένεση. Η μειορύθμιση του οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο εκτός και αν επηρεαστεί από την ενεργοποίηση παραγόντων επιβίωσης όπως η *Bcl-2*, η οποία οδηγεί τα νεοπλασματικά κύτταρα σε συνεχή πολλαπλασιασμό. Το γεγονός ότι η σκλαρεόλη προκαλεί μειορύθμιση του *c-myc* χωρίς να επηρεάζει την έκφραση της *Bcl-2* έχει ως αποτέλεσμα την μετάβαση των καρκινικών κυττάρων σε αποπτωτικό θάνατο.

Η *ex vivo* μελέτη της σκλαρεόλης στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων έδειξε ότι η σκλαρεόλη δεν προκαλεί διέγερση των αιμοπεταλίων, αντιθέτως αναστέλλει την συσσώρευση τους, έπειτα από ενεργοποίηση τους με τους διεγέρτες ADP και PAF. Δεδομένου ότι είναι σε θέση να προκαλέσει αναστολή της κυκλοξυγενάσης (Huang et al., 2012), παρόλο που δεν φέρει χαρακτηριστικά αντιφλεγμονώδους παράγοντα, ίσως η δράση της στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων να οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς.

Τα αποτελέσματα της *in vivo* μελέτης της σκλαρεόλης σε επίμυες Wistar δείχνουν ότι η σκλαρεόλη δε φέρει τοξική δράση και δεν προκαλεί αλλοίωση των οργάνων των πειραματόζωων στις μικρότερες συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν (40mg/kg, 120mg/kg), αντιθέτως προκαλεί πνευμονικό οίδημα έπειτα από άμεση χορήγηση υψηλών δόσεων της (400mg/kg, 800mg/kg, 1000mg/kg). Η άμεση ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 40mg/kg, 120mg/kg και 400mg/kg σκλαρεόλης δεν προκαλεί καμία μεταβολή στη συμπεριφορά και την κινητικότητα των πειραματόζωων. Αντιθέτως η χορήγηση 800mg/kg και 1000mg/kg προκαλεί έντονη δύσπνοια και μείωση της κινητικότητας των πειραματόζωων δύο ώρες μετά τη χορήγηση της. Τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση της σκλαρεόλης παρατηρείται πλήρης καταστολή και τα πειραματόζωα βρίσκονται σε κατάσταση ακινησίας, ενώ οι καρδιακοί παλμοί και τα ανατακλαστικά τους είναι φυσιολογικά. Η καταστολή διαρκεί τουλάχιστον 12 ώρες, ενώ μετά από 24 ώρες τα πειραματόζωα έχουν επανέλθει πλήρως στην φυσιολογική τους κατάσταση.

Τα δεδομένα από την χρόνια τοξικότητα δείχνουν ότι η σκλαρεόλη δεν έχει τοξική δράση και δεν προκαλεί αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζωων, έπειτα από συνολική χορήγηση 149,84mg/kg, 800mg/kg και 4g/kg. Έπειτα από συνολική χορήγηση 2,5g/kg παρατηρούνται στα πειραματόζωα τα ίδια συμπτώματα που εμφάνισαν τα πειραματόζωα κατά την οξεία τοξικότητα στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή δύσπνοια, καταστολή και αδυναμία κίνησης, τα οποία επανέρχονται στη φυσιολογική τους κατάσταση έπειτα από 24 ώρες. Το γεγονός ότι κατά τη χρόνια τοξικότητα οι παρενέργειες της σκλαρεόλης εμφανίζονται έπειτα από συνολική χορήγηση 2,5g/kg σε σχέση με την οξεία τοξικότητα όπου οι παρενέργειες εμφανίζονται έπειτα από χορήγηση 800mg/kg και δεδομένου ότι δεν εμφανίζονται αλλοιώσεις στα όργανα των πειραματόζωων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η σκλαρεόλη θα μπορούσε να χορηγηθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις σταδιακά, χωρίς την εμφάνιση παρενεργειών και την πρόκληση αλλοιώσεων στα όργανα και τους ιστούς *in vivo*.

Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με μελέτες που έγιναν σε επίμυες Sprague Dawley όπου η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 5g/kg σκλαρεόλης προκάλεσε δυσκολία στην κίνηση και την αναπνοή των πειραματόζωων, τα οποία επανήλθαν πλήρως στην φυσιολογική τους κατάσταση έπειτα από 4 ώρες (Bhatia et al., 2008). Επίσης αναφέρεται ότι η LD₅₀ της σκλαρεόλης είναι άνω των 5g/kg (Sashidhara et al., 2007), γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα δεδομένα των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Κατά τη χορήγηση της σκλαρεόλης σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar παρατηρείται μεγαλύτερη κινητικότητα στην ομάδα όπου χορηγείται η μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Στην ομάδα αυτή παρατηρείται επίσης αυξημένη πρόσληψη νερού και αποβολής ούρων, η οποία είναι στατιστικά σημαντική και θεωρείται ότι οφείλεται στην αύξηση των μεταβολικών διεργασιών των πειραματόζωων. Οι παρενέργειες που εμφανίστηκαν κατά τη μελέτη της οξείας και της χρόνιας τοξικότητας (δυσκολία στην κίνηση και την αναπνοή και καταστολή) δεν παρουσιάζονται σε καμία ομάδα πειραματόζωων. Ο ρυθμός αύξησης του βάρους του όγκου καθώς και το μέσο βάρος του είναι μεγαλύτερος στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τις δύο ομάδες θεραπείας. Επίσης, το 50% των πειραματόζωων της δεύτερης ομάδας θεραπείας (χορήγηση 2,64g/kg σκλαρεόλης) επιζεί μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας και παρουσιάζεται αύξηση του

προσδόκιμου χρόνου επιβίωσης των ζώων (T/C%) κατά 35% ($p=0,05$). Παρόλα αυτά, η μεγαλύτερη αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου παρατηρείται στην πρώτη ομάδα θεραπείας που έλαβε συνολικά 0,7g/kg σκλαρεόλης (TWI 16%, $p>0,05$), όπου τα πειραματόζωα της ομάδας αυτής δεν επιβίωσαν μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, σύμφωνα με τον ιστοπαθολογοανατομικό έλεγχο η σκλαρεόλη δεν προκάλεσε αλλοίωση στα όργανα των πειραματόζωων σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα δεδομένα αυτά όπως φαίνεται δεν ταυτίζονται με άλλες *in vivo* μελέτες που έχουν γίνει, όπου η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της σκλαρεόλης (560 mg/kg) σε ξενογραφικά ποντίκια με καρκίνο του παχέος εντέρου προκαλεί αναισθησία εντός 15 λεπτών και θάνατο άνω του 50% των πειραματόζωων την επόμενη μέρα της χορήγησης, ενώ παρατηρείται δυσκινησία και σοβαρή αταξία στα υπόλοιπα πειραματόζωα τα οποία επίσης πεθαίνουν έπειτα από συνολική χορήγηση 851,8mg/kg και 1100mg/kg σκλαρεόλης. Αντιθέτως η χορήγηση της μέσω της μορφής των λιποσωμάτων δεν προκαλεί θάνατο αλλά παρατηρούνται παρενέργειες όπως αταξία και μικρή απώλεια βάρους τα οποία επανέρχονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επίσης η χορήγηση 1100mg/kg σκλαρεόλης στην λιποσωμική μορφή της προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου κατά 20% και αυξάνει το προσδόκιμο του χρόνου επιβίωσης των πειραματόζωων κατά 40% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (Hatziantoniou et al., 2006).

Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 333mg/kg σκλαρεόλης ανά τέσσερις ημέρες σε ξενογραφικά ποντίκια με καρκίνο του παχέος εντέρου προκαλεί θάνατο άνω του 50% των πειραματόζωων μετά την πρώτη χορήγηση ενώ τα υπόλοιπα πεθαίνουν μία εβδομάδα αργότερα. Αντιθέτως η χορήγηση της σκλαρεόλης μέσω των λιποσωμάτων δεν προκαλεί θάνατο και παρενέργειες στα πειραματόζωα, ενώ παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου κατά 60% και αύξηση του χρόνου επιβίωσης κατά 40% λίγες ημέρες μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (Mahaira et al., 2011).

Επιπλέον μελέτες δείχνουν πως η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της σκλαρεόλης (50 mg/kg για 5 μέρες επί 3 εβδομάδες) δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του όγκου του παχέος εντέρου ξενογραφικών ποντικών ενώ στην λιποσωμική μορφή της (275mg/kg) ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου μειώνεται κατά 40% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η δράση της λιποσωμικής της μορφής, όπως αποδείχθηκε, οφείλεται

στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λόγω της αναστολής της έκφρασης του πυρηνικού αντιγόνου Ki67/MIB1, το οποίο αποτελεί δείκτη των κυττάρων με πολλαπλασιαστική ικανότητα. Σε αυτή την πειραματική πορεία, καμία παρενέργεια δεν παρατηρήθηκε (Dimas et al., 2007).

Παρατηρείται ότι η σκλαρεόλη προκαλεί θάνατο στις πειραματικές διαδικασίες που αναφέρθηκαν, ενώ στην παρούσα διατριβή κανένα ζώο δεν πέθανε έπειτα από τη χορήγηση της. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών πειραματόζωων, καθώς στις μελέτες που αναφέρθηκαν χρησιμοποιούνται ποντίκια SCID (mice) ενώ στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν επίμυες Wistar. Επιπλέον το μοντέλο καρκινογένεσης διαφέρει, καθώς τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται στις άλλες μελέτες είναι ξενογραφικά με καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ στην παρούσα διατριβή προκλήθηκε καρκινογένεση έπειτα από ενοφθαλμισμό κυττάρων λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar στο κεντρικό τμήμα της ωμικής ζώνης των ζώων. Ένας άλλος παράγοντας που πιθανώς να οφείλεται για το γεγονός αυτό, είναι η χρήση διαφορετικών διαλυμάτων για τη χορήγηση της σκλαρεόλης, καθώς στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιείται η τρικαπριλίνη ενώ στις άλλες μελέτες χρησιμοποιείται το μίγμα φυσιολογικού ορού (80%, v/v)-απόλυτης αιθανόλης (10%, v/v)-PEG 400 (5%, v/v)-Tween-40 (5%, v/v).

Αντιθέτως άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι η άμεση χορήγηση της σκλαρεόλης στο εσωτερικό του όγκου (7,85 μg/ημέρα/ποντίκι για 6 μέρες) σε ποντίκια με εμφυτευμένο τμήμα όγκου προκαλεί αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης του νεοπλασματικού μορφώματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης παρατηρείται αύξηση της ιντερφερόνης γ (INF- γ) και μείωση της ιντερλευκίνης 4 (IL-4) σε καλλιέργειες απομονωμένων σπληνοκυττάρων, αύξηση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας και αξιόλογη μείωση ενός χαρακτηριστικού υποπληθυσμού κατασταλτικών λεμφοκυττάρων T, των CD4+CD25+Foxp3+ Τα λεμφοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται στο σημείο του όγκου, καταστέλλουν την κυτταροτοξική ικανότητα των επιθετικών T λεμφοκυττάρων ενάντια στον όγκο αλλά επίσης καταστέλλουν και την ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού ενάντια στον όγκο. Η δράση των κατασταλτικών T λεμφοκυττάρων είναι συνεπώς ενισχυτική για την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, οπότε ο έλεγχός τους είναι σημαντικός για την επιτυχία μιας ανοσοθεραπευτικής παρέμβασης (Noori et al., 2010).

Συνεπώς στο σημείο αυτό η σκλαρεόλη παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην λεπτή ρύθμιση των ανοσοποιητικών αντιδράσεων του οργανισμού απέναντι στους εξωγενώς εμφυτευόμενους όγκους. Αν θεωρήσουμε ότι σε κάθε υγιή οργανισμό οι ανοσολογικές άμυνες αποτελούν το κορυφαίο σύστημα αποτροπής της ανάπτυξης αποικιών κακοήθων κυττάρων, αντιλαμβανόμαστε ότι ουσίες όπως η σκλαρεόλη είναι πολύ σημαντικές, τόσο ως παράγοντες ενίσχυσης της αντικαρκινικής ανοσίας, αλλά και ως εργαλεία μελέτης των τρόπων ενίσχυσης αυτής, δεδομένου ότι στον καρκίνο αυτός ακριβώς ο τύπος ανοσίας έχει υποστεί μια καθοριστική και μακροχρόνια κάμψη. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την καρκινική ανοσοθεραπεία όπου φαίνεται πως είτε απομακρύνοντας τα κατασταλτικά T λεμφοκύτταρα, είτε απενεργοποιώντας την ανοσοκατασταλτική λειτουργία τους (που οδηγεί σε προστασία του όγκου), είμαστε σε θέση να αυξήσουμε σημαντικά τον μαζικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων έπειτα από έγχυση της σκλαρεόλης μέσα στον όγκο και μέσω αύξησης της αποτελεσματικότητας των αντικαρκινικών ορών και της καρκινικής ανοσοθεραπείας. Αυτός είναι ένας χώρος δράσεων πολύ σημαντικός διότι ενισχύει ισχυρά την αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, στο βαθμό που το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς δεν έχει καταστραφεί από τις κυτταροτοξικές θεραπείες.

Άλλα τερπένια που έχουν βρεθεί στο φυτό *Viscum album* είναι το μπετουλινικό οξύ, το ολεανολικό οξύ (Jager et al., 2007) και το ουρσολικό οξύ. Πρόκειται για τριτερπένια των οποίων η δράση έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και έχει αποδειχθεί ότι έχουν κυτταροτοξική δράση στις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές Molt4, K562 και U937 και προκαλούν θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (Jager et al., 2007, Urech et al., 2005).

Άλλες μελέτες δείχνουν πως το τριτερπενικό εκχύλισμα του φυτού *Viscum album*, πλούσιο σε ολεανολικό οξύ προκαλεί μείωση του κυτταρικού ATP των B16.F10 μελανωματικών κυττάρων και ότι ο πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων αναστέλλεται μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (Strüh et al., 2012). Επιπλέον, φαίνεται ότι το τριτερπενικό εκχύλισμα του φυτού αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων *in vitro* μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης η οποία οφείλεται στην δράση των κασπασών 8 και 9 (Delebinski et al., 2012).

Γενικά υπάρχει μία πληθώρα τερπενίων στη φύση με αντικαρκινικές ιδιότητες τα οποία επίσης ανήκουν στην κατηγορία των λαβδανικών διτερπενίων, όπως το ent-

labd-7-en-13S,14R,15-triol, το οποίο απομονώθηκε από το εξανικό κλάσμα του φυτού *Gymnosperma glutinosum* και φέρει ισχυρή κυτταροτοξική δράση στην λεμφατική καρκινική κυτταρική σειρά L-5178Y-R (Gomez-Flores et al., 2012).

Επίσης το λαβδανικό διτερπένιο βίλλοσίνη (villosin), το οποίο απομονώθηκε από το φυτό *Hedychium gardnerianum* φέρει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες στην καρκινική κυτταρική σειρά του πνεύμονα NCI-H187, ενώ στην φυσιολογική κυτταρική σειρά Vero η τοξική του δράση είναι μη ανιχνεύσιμη. Χαρακτηριστικό είναι επίσης το γεγονός ότι η δράση του λαβδανικού αυτού διτερπενίου είναι τέσσερις φορές ισχυρότερη από εκείνη του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ελλιπτισίνη (ellipticine) (Kumrit et al., 2010).

Τα λαβδανικό διτερπένια βιτεξилаκτόνη (vitexilactone), (rel 5S,6R,8R,9R,10S)-6-acetoxy-9-hydroxy-13(14)-labden-16,15-olide, ροτουντιφουράνιο (rotundifuran), βιτετριφολίνη D (vitetrifolin D) και βιτετριφολίνη E (vitetrifolin E) τα οποία απομονώθηκαν από το φυτό *Vitex trifolia L* φέρουν κυτταροτοξικές ιδιότητες, επάγοντας τη διαδικασία της απόπτωσης στα λευχαιμικά κύτταρα K562 ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις προκαλούν αναστολή του πολλαπλασιασμού τους στην G0/G1 φάση. Επιπλέον, όπως αποδείχθηκε, η κυτταροτοξική δράση του ροτουντιφουρανίου (rotundifuran) είναι ισχυρότερη από εκείνη της σισπλατίνης (cis-platinum) (Li et al., 2005).

Το πιο διαδεδομένο τερπένιο, το οποίο χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια στη θεραπεία του καρκίνου, είναι η ταξόλη (πακλιταξέλη). Η ταξόλη είναι ένα διτερπένιο, το οποίο ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στον φλοιό του δέντρου *Taxus brevifolia*, ενός είδους ελάτου και οι αντικαρκινικές της ιδιότητες έγιναν γνωστές μετά το 1964, ενώ το 1992 εγκρίθηκε από τον διεθνή οργανισμό φαρμάκων (Rodriguez-Antona, 2010). Η ταξόλη έχει αντικαρκινική δράση σε ποικίλες νεοπλασματικές σειρές και κυρίως στους συμπαγείς όγκους. Σε λευχαιμικές σειρές έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την αγγειογένεση αναστέλλοντας την παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF και την έκφραση του παράγοντα HIF- α (Gupta et al., 2010). Επιπλέον οι αντικαρκινικές της ιδιότητες είναι ανεξάρτητες από την έκφραση του γονιδίου p53 ενώ ο μηχανισμός δράσης της διαφέρει ανάλογα τη συγκέντρωση της και την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι συγκεντρώσεις της ταξόλης άνω των 9nm

προκαλούν παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2/M ενώ συγκεντρώνει μικρότερες από αυτήν προκαλούν κυτταρικό θάνατο έπειτα από εκτροπή της μίτωσης σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα A549 (Bacus et al., 2001).

Η ταξόλη είναι σημαντικός αντineοπλασματικός παράγοντας για διάφορες μορφές καρκίνου, όπως ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού (Gradishar, 2012), ο προχωρημένου σταδίου καρκίνος των ωοθηκών και ο καρκίνος του πνεύμονα. Η δράση της οφείλεται στην ικανότητα της να προσδένεται στην β-τουμπουλίνη της ετεροδιμερούς πρωτεΐνης α,β-τουμπουλίνης, να προωθεί τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους. Η υπερβολική σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων καθιστά αδύνατη την κυτταρική διαίρεση του κυττάρου μέσω της διαδικασίας της μίτωσης, με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να οδηγείται σε απόπτωση (Sun et al., 2009).

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, υπάρχουν διάφορα φυτά στην φύση, των οποίων τα συστατικά φέρουν ποικίλες αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως το φυτό *Viscum album*. Ο παρασιτικός χαρακτήρας του *Viscum* και το γεγονός ότι κάποιες ιδιότητες των δέντρων-ξενιστών που παρασιτεί μεταβιβάζονται σε αυτό, του προσδίδουν ποικίλες θεραπευτικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες που προκύπτουν – κατά τα φαινόμενα – από τον ξενιστή, προφανώς αντιστοιχούν σε χημικές ουσίες που εισέρχονται στο παρασιτικό φυτό μέσω των μυζητήρων από το σύστημα μεταφοράς χυμών του ξενιστή.

Το διτερπένιο το οποίο απομονώθηκε από το *Viscum album*, καθώς επίσης και το δομικά ανάλογο του σκλαρεόλη, φέρουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Δεδομένου ότι η σκλαρεόλη υπάρχει στα κωνοφόρα δέντρα (Kyriku et al., 2005), πιθανόν και η ουσία που απομονώθηκε από το *Viscum album* να μεταβιβάστηκε σε αυτό μέσω του ξενιστή του. Το γεγονός αυτό δίνει το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη όχι μόνο του διτερπενίου που απομονώθηκε, αλλά και του ξενιστή του φυτού.

Δεδομένου ότι τα αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για την καταπολέμηση των νεοπλασμάτων επιφέρουν ποικίλες παρενέργειες λόγω της τοξικότητάς τους στον ανθρώπινο οργανισμό και έχουν υψηλό κόστος, η σκλαρεόλη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας νέος και αποτελεσματικός αντineοπλασματικός παράγοντας, ο οποίος εξ αιτίας της χαμηλής του τοξικότητας για τον οργανισμό αλλά και του χαμηλού κόστους της, εμφανίζει ουσιαστικά πλεονεκτήματα για χρήση ως αντικαρκινικό φάρμακο. Είναι επίσης πολύ σημαντικό

να αναφέρουμε ότι από οικονομικής πλευράς η σκλαρεόλη είναι πολύ ανταγωνιστική καθώς αποτελεί μια ουσία η οποία υπάρχει σε αφθονία στη φύση. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι ένα δομικά ανάλογο της ουσίας αυτής απαντάται και στο *Viscum album*, το οποίο αποτελεί ένα πολυδύναμο φαρμακευτικό φυτό και ερμηνεύει έτσι ένα μέρος των σημαντικών αντικαρκινικών ιδιοτήτων του εν λόγω φυτού, οι οποίες δεν μπορούσαν να καλυφθούν μόνον από την ύπαρξη των λεκτινών και των βισκοτοξινών, αλλά ούτε και από την ύπαρξη πολυφαινολικών μορίων (φλαβονοειδών). Η τερπενική φύση της ουσίας που απομονώθηκε από το φυτό αιτιολογεί πολύ καλά μια σημαντική συνιστώσα των αντικαρκινικών δράσεων του *Viscum album*, κατά τρόπο ενδεχομένως οριστικό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή συμπεραίνονται τα εξής:

- Το αιθερικό υδρόφοβο κλάσμα του φυτού *Viscum album*, το οποίο περιέχει τα ουδέτερα λιπιδιακά συστατικά του φυτού, έχει την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής και χειμερινής εποχής συγκομιδής σε σχέση με το αιθανολικό, το χλωροφορμικό και το υδατομεθανολικό κλάσμα. Η κυτταροτοξική του δράση στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 είναι μικρότερη από αυτήν στα καρκινικά κύτταρα, αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα που μελετήθηκαν.
- Τα ουδέτερα λιπιδιακά συστατικά του φυτού *Viscum album* μεταβάλλονται ανάλογα με την εποχή συγκομιδής του φυτού, καθώς επίσης μεταβάλλεται και η συγκέντρωση αυτών ανάλογα με την εποχή. Κατά την χειμερινή εποχή συγκομιδής εμφανίζονται λιπίδια που απουσιάζουν την καλοκαιρινή περίοδο, ενώ η συγκέντρωσή τους κατά τους χειμερινούς μήνες είναι αυξημένη σε σχέση με την καλοκαιρινή περίοδο.
- Το ουδέτερο λιπιδιακό συστατικό του φυτού με την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση στην κυτταρική σειρά MCF-7 και την λιγότερο τοξική δράση στους φυσιολογικούς ινοβλάστες MRC-5 εμφανίζεται κατά την χειμερινή περίοδο, οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης και είναι δομικά ανάλογο του διτερπενίου σκλαρεόλη.
- Η σκλαρεόλη εμφανίζει ισχυρή δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση στις νεοπλασματικές σειρές MCF-7, LMS, U2OS HeLa, ενώ στην κυτταρική σειρά MRC-5 είναι λιγότερο δραστική.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί μόνιμη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της.
- Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλεί η σκλαρεόλη είναι ο αποπτωτικός και η δράση της αυτή εξαρτάται από την συγκέντρωση που χορηγείται.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

- Η σκλαρεόλη ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις δεν προκαλεί θάνατο στα πειραματόζωα και θεωρείται ότι το LD₅₀ της είναι μεγαλύτερο από 5g/kg.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί δυσκινησία και καταστολή έπειτα από χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων της (άνω των 800mg/kg) στα πειραματόζωα, τα οποία επανέρχονται στη φυσιολογική τους κατάσταση έπειτα από 24 ώρες.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί πνευμονικό οίδημα έπειτα από άμεση χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων της ενώ έπειτα από σταδιακή χορήγηση συνολικά μεγάλων συγκεντρώσεων της δεν παρουσιάζονται βλάβες στα όργανα των πειραματόζωων.
- Η σκλαρεόλη προκαλεί 16% αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης του όγκου σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, έπειτα από συνολική χορήγηση 700mg/kg βάρους σώματος κατόπιν θεραπείας διάρκειας ενός μήνα
- Η σκλαρεόλη προκαλεί 35% παράταση του χρόνου ζωής επίμυων Wistar με ανάπτυξη σαρκωματικού όγκου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, έπειτα από συνολική χορήγηση 2,64g/kg βάρους σώματος κατόπιν θεραπείας διάρκειας ενός μήνα.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Θέμα διδακτορικής διατριβής: Ανάλυση, απομόνωση και έλεγχος των βιολογικών δράσεων λιπιδιακών ουσιών του φυτού *Viscum album* L. σε διάφορα μοντέλα καρκίνου.

Το *Viscum album* είναι ένα παρασιτικό φυτό γνωστό από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Το 1917 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη θεραπεία του καρκίνου και έκτοτε αρκετές μελέτες έχουν γίνει για την αντικαρκινική δράση του εκχυλίσματος του αλλά και των πρωτεϊνών του (λεκτίνες και βισκοτοξίνες), η οποία επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι εποχικές διακυμάνσεις. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η αντικαρκινική δράση του φυτού δεν βασίζεται εξ ολοκλήρου στην ύπαρξη των λεκτινών και των βισκοτοξινών, αλλά υπάρχουν και άλλα μόρια, χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία δρουν επίσης κυτταροτοξικά. Παρόλα αυτά, ελάχιστες έρευνες έχουν γίνει για τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους του φυτού.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκαν τα λιπιδιακά κλάσματα του φυτού *Viscum album ssp. abietis* κατά τη διάρκεια δύο διαφορετικών εποχών συγκομιδής, της χειμερινής (Δεκέμβριος-Ιανουάριος) και της καλοκαιρινής (Ιούνιος-Ιούλιος) περιόδου σύμφωνα με τις μεθόδους Bligh-Dyer και Galanos-Karoulas και κατόπιν μελετήθηκε η κυτταροτοξική τους δράση στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MRC-5 με τη μέθοδο του MTT. Το κλάσμα που εμφάνισε την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση κατά τη διάρκεια και των δύο εποχών, αναλύθηκε περαιτέρω με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Κατόπιν πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδιακών συστατικών που απομονώθηκαν μέσω οξείδωσης με διχρωμικό άλας και έπειτα μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση τους στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MRC-5 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT. Ο έλεγχος του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί το λιπιδιακό συστατικό με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα και την ασθενέστερη δράση στα φυσιολογικά κύτταρα μελετήθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Έπειτα αυτό το λιπιδιακό συστατικό ταυτοποιήθηκε με τη μέθοδο της Υψηλής Ανάλυσης Υγρής Χρωματογραφίας Ανάστροφης Φάσης (RP-

HPLC) και την τεχνική της Φασματοσκοπίας Μάζας μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS).

Η δοσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη αντικαρκινική δράση της δομικά ανάλογης ουσίας του συστατικού αυτού μελετήθηκε περαιτέρω στις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7, U2OS, HeLa και MRC-5 με τις μεθόδους MTT και Trypan blue. Επίσης μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης αποικιών των νεοπλασματικών κυττάρων LMS και MCF-7 έπειτα από επώαση τους με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του συστατικού αυτού. Ο μηχανισμός θανάτου που προκαλεί η ουσία στα κύτταρα μελετήθηκε με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης στις κυτταρικές σειρές LMS, MCF-7 και MRC-5, καθώς επίσης και μέσω κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας την καρκινική κυτταρική σειρά MCF-7. Επιπλέον ελέγχτηκε η ανασταλτική δράση της ουσίας αυτής στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων του ανθρώπου *ex vivo*. Ακολούθησε έλεγχος της τοξικής δράσης του λιπιδιακού συστατικού σε επίμυες Wistar μέσω των μοντέλων οξείας και χρόνιας τοξικότητας και έπειτα μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση του σε καρκινοπαθείς επίμυες Wistar έπειτα από πρόκληση κακοήθους νεοπλασίας μέσω ενοφθαλμισμού λειομυοσαρκωματικών κυττάρων LMS.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το λιπιδιακό κλάσμα του φυτού με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση είναι το αιθερικό κλάσμα, το οποίο περιέχει όλα τα ουδέτερα λιπίδια του φυτού (τερπένια, υδρογονάνθρακες, στερόλες). Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αποκάλυψε την ύπαρξη 6 κοινών λιπιδιακών συστατικών κατά την καλοκαιρινή και χειμερινή εποχή συγκομιδής και 2 επιπλέον λιπιδιακών συστατικών κατά την χειμερινή εποχή συγκομιδής. Οι συγκεντρώσεις των λιπιδιακών συστατικών που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια και των 2 εποχών συγκομιδής παρατηρείται ότι διαφέρουν και εμφανίζονται αυξημένες κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Επίσης η κυτταροτοξική δράση των λιπιδιακών συστατικών είναι μεγαλύτερη κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου. Το λιπιδιακό συστατικό με την ισχυρότερη κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα και την ασθενέστερη δράση στα φυσιολογικά κύτταρα απομονώθηκε κατά τη διάρκεια της χειμερινής εποχής συγκομιδής. Η ταυτοποίηση του συστατικού αυτού έδειξε ότι πρόκειται για ένα διτερπένιο, δομικά ανάλογο της σκλαρεόλης.

Η σκλαρεόλη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο και οι βλάβες που προκαλεί στα καρκινικά κύτταρα είναι μη αναστρέψιμες. Επίσης η σκλαρεόλη προκαλεί αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων η οποία αυξάνεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της *ex vivo*.

Οι *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η σκλαρεόλη δεν προκαλεί θάνατο σε επίμυες Wistar, ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ($LD_{50} > 5\text{g/kg}$). Η άμεση χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων της προκαλεί πνευμονικό οίδημα, αντιθέτως η σταδιακή χορήγηση της σκλαρεόλης, ακόμα και πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων, δεν προκαλεί βλάβη στα όργανα των πειραματόζων. Οι παρενέργειες που προκαλεί στα πειραματόζωα έπειτα από χορήγηση μεγάλων συγκεντρώσεων της είναι δυσκινησία, καταστολή και δυσκολία στην αναπνοή, τα οποία επανέρχονται έπειτα από 24 ώρες στη φυσιολογική τους κατάσταση. Επιπλέον μειώνει το μέγεθος του όγκου καρκινοπαθών επίμυων Wistar κατά ένα μικρό ποσοστό (16%) ενώ αυξάνει τον χρόνο επιβίωσης τους κατά 35% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύεται ότι το χαμηλού μοριακού βάρους διτερπένιο που απομονώθηκε από το φυτό, εμφανίζει αντικαρκινική δράση η οποία εξαρτάται από την εποχή συγκομιδής του φυτού. Επίσης η σκλαρεόλη, η δομικά ανάλογη ουσία του συστατικού αυτού, φέρει ισχυρή κυτταροτοξική δράση *in vitro*. Λόγω της χαμηλής τοξικότητας που εμφανίζει και τον ήπιων παρενεργειών που προκαλεί *in vivo*, αποτελεί ένα συστατικό ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, το οποίο μελλοντικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας νέος αντινεοπλασματικός παράγοντας.

7. SUMMARY

Thesis subject: Analysis, isolation and study of the biological effects of lipid substances of the plant *Viscum album* L. in various cancer models.

Viscum album L. is a hemiparasitic plant known for centuries for its therapeutic properties. In 1917 it was first used in the treatment of cancer and since then several studies have been conducted on the antitumor activity of the plant extracts and the plant proteins (lectins and viscotoxins). The anticancer activity of the plant is influenced by various factors, such as seasonal variations. Many studies indicate that the anticancer effect of the plant is not entirely based on the existence of lectins and viscotoxins, but there are other low molecular weight components with high cytotoxic activities too. However, few studies have been conducted for the low molecular weight components of the plant.

In the present thesis, the lipid fractions of the plant *Viscum album ssp. abietis* were isolated during two different harvesting times, the winter (December-January) and the summer (June-July) time according to the methods proposed by Bligh-Dyer and Galanos-Kapoulas. The cytotoxic activities of these fractions were evaluated via the MTT assay using the breast cancer cell line MCF-7 and the human embryonic fibroblasts MRC-5 as physiological control cell line. The lipids of the extracted fraction with the highest anticancer properties were separated by thin layer chromatography (TLC) and quantified using the Dichromate-Oxidizing method. Their cytotoxic properties were studied via the MTT assay, using the cell lines MCF-7 and MRC-5. The lipid component with the highest antitumor properties and the less cytotoxic activities in normal cells was identified using the HPLC and ESI-MS methods.

The dose-dependent and the time-dependent antitumor effect of this substance were studied in LMS, MCF-7, U2OS, HeLa and MRC-5 cell lines via the MTT and Trypan blue methods. In addition, the ability of colony efficiency capacity in LMS and MCF-7 cancer cells after incubation with increasing concentrations of the isolated lipid was determined. The cell death mechanism caused by the isolated lipid component of the plant was investigated with DNA electrophoresis in agarose using

the LMS, MCF-7 and MRC-5 cell lines, as well as by flow cytometry using the cancer cell line MCF-7.

Furthermore, the inhibitory effect of the isolated component in human platelet aggregation was tested, *ex vivo*, using ADP and PAF as stimulators. The *in vivo* toxic activity of the lipid component was studied in Wistar rats, using the models of acute and chronic toxicity and the *in vivo* antitumor effect was studied in Wistar rats after challenge malignant neoplasia by inoculating LMS tumor cells.

According to our results, the extraction procedure allowed us to obtain four fractions. The chloroform phase (fraction 1) of the Bligh and Dyer extraction contains the lipids and the water/methanol phase (fraction 2) contains more polar substances. Moreover, the distribution of the lipids by the Galanos - Kapoulas method led us to separate the chloroform phase in two other fractions. The ether fraction (fraction 4), which contains the less polar lipids, including sterols, terpenes, hydrocarbons etc, and the ethanol fraction (fraction 3) which contains the more polar lipids including phospholipids and free fatty acids.

The cytotoxic activity of the chloroform fraction (fraction 1) on MCF-7 breast cancer cells was higher compared to the water/methanol phase (fraction 2). In addition, the cytotoxic activity was higher in the leaves selected in the winter harvesting time. The ethanol fraction (fraction 3) was less cytotoxic on MCF-7 breast cancer cells compared to the neutral ether fraction 4, whose cytotoxicity was elevated in the winter time of harvesting. All the fractions were less cytotoxic on the physiological cell line MRC-5 (Table 1).

Table 1. Comparison of the cytotoxic activity of the fractions using the cell lines MCF-7 and MRC-5 during the winter and the summer time of harvest.

Fractions	Concentration (mg/ml)	% Survival			
		MCF-7 cells		MRC-5 cells	
		Winter	Summer	Winter	Summer
Fraction 1	9	2±2,67	43±2,53	28±2,06	50±3,28
Fraction 2	20	13±7,2	80±2,97	74±3,12	80±1,26
Fraction 3	0,75	13,5±2,12	51±7,04	93±4,46	76±1,92
Fraction 4	0,75	1±5,4	22±2,04	31±0,68	69±3,81

The ether neutral lipid fraction showed higher cytotoxic activity compared to the more polar fractions and was further analyzed with Thin Layer Chromatography. TLC revealed six zones (zones I, II, III, V, VI, VIII) during the summer harvesting time and eight zones (zones Ib, IIb, IIIb, IVb, Vb, VIb, VIIb, VIIIb) during the winter time of harvest. It was observed that zones IVb and VIIb (and thus the relevant lipids) of the winter fraction had not appeared in the summer fraction. The quantities of the lipids during both seasons were estimated using the Dichromate Oxidizing method. As was observed, the quantities of lipid components during the summer period were lower than those in winter. The lipid components of zone VI had the lowest quantity during both seasons while the lipid II and V were found in larger quantities during the summer period and lipid IIb during the winter period.

The cytotoxic activity of the lipid components of the hydrophobic ether fraction were evaluated using the MTT assay. According to our results, the inhibitory activity on the cancer cell proliferation during the winter harvesting time was higher compared to the lipid constituents of the summer time of harvest. Lipid IVb was the most cytotoxic on tumor cell line MCF-7 and the physiological cell line MRC-5 with IC_{50} values $0,065 \pm 0,024$ mg/ml and $0,088 \pm 0,036$ mg/ml respectively. The lipid Vb exhibited higher cytotoxic activities on MCF-7 cells compared to MRC-5 cells with IC_{50} values $0,160 \pm 0,017$ mg/ml and $0,556 \pm 0,027$ mg/ml respectively.

The cell death mechanism caused by the isolated lipid component Vb of the plant was investigated with DNA electrophoresis in agarose using the breast cancer cell line MCF-7. Our results indicated the presence of DNA fragments and revealed that the lipid Vb leads the cells to death through the apoptotic mechanism.

Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) and Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) showed that the lipid component Vb is a diterpene, probably having molecular formula $C_{20}H_{32}O_2$ or $C_{20}H_{33}O_2$ and its molecular weight is either 304,2 or 305. These data revealed that the isolated unknown diterpene is a structure analogue of the diterpene sclareol. Sclareol is a labdane diterpene having the molecular formula $C_{20}H_{36}O_2$ and a molecular weight of 308,5.

Due to financial reasons, we decided to perform the following experimental procedures with the diterpene sclareol, commercially available.

The antitumor activity of sclareol was studied on LMS, MCF-7, U2OS, HeLa and MRC-5 cell lines via the MTT and Trypan blue methods. According to both methods, sclareol inhibited the cell proliferation of all the tested tumor cell lines in a dose-dependent and time-dependent manner, while it was less cytotoxic in normal fibroblasts (Table 2).

Table 2. IC₅₀ values after 24h, 48h and 72h of incubation of sclareol with the cell lines LMS, MCF-7, U2OS, HeLa and MRC-5, using the MMT assay.

Cell line Time of incubation	LMS cells	MCF-7 cells	U2OS cells	HeLa cells	MRC-5 cells
24h	69,4±1,3µM	87±1,56µM	51±1,12µM	88,7±2,31µM	75±2,75µM
48h	46 ±1,78µM	53,23±0,97µM	44,6±1,31µM	78,6±1,98µM	71,3±2,34µM
72h	38,8±1,6µM	48±1,42µM	40,1±1,19µM	49,3±2,10µM	64,3±0,96µM

As was observed, sclareol has the ability to induce DNA damage to the cell lines LMS, MCF-7 and MRC-5 in a dose-dependent manner and leads to apoptotic cell death. Moreover, sclareol inhibits colony forming ability and causes permanent damage to the cancer cell lines LMS and MCF-7 in a dose-dependent manner.

The *ex vivo* experimental procedures showed that sclareol does not stimulate the platelet aggregation. Instead, sclareol inhibits the platelet aggregation after activation by the stimulators ADP and PAF, in a dose-dependent manner.

The results obtained from the acute toxicity showed that sclareol had no obvious toxic effect on the experimental animals even at high concentrations. Administration of concentrations higher than 400 mg/kg of sclareol causes histological signs of pulmonary edema initiation in experimental animals, but this condition might be an artifact derived from the diethyl ether action during sacrifice of animals. Side effects such as inability to move, difficulties in breathing and generalized neuromuscular depression were observed only at the highest concentrations that were used. It is important to note that within 24 hours the experimental animals returned to their physiological condition.

According to our data obtained from the chronic toxicity, sclareol does not cause death to the experimental animals and the LD₅₀ of sclareol is higher than 5g/kg. Moreover, the gradual administration of high concentrations of sclareol does not damage or alter the vital organs of the animals.

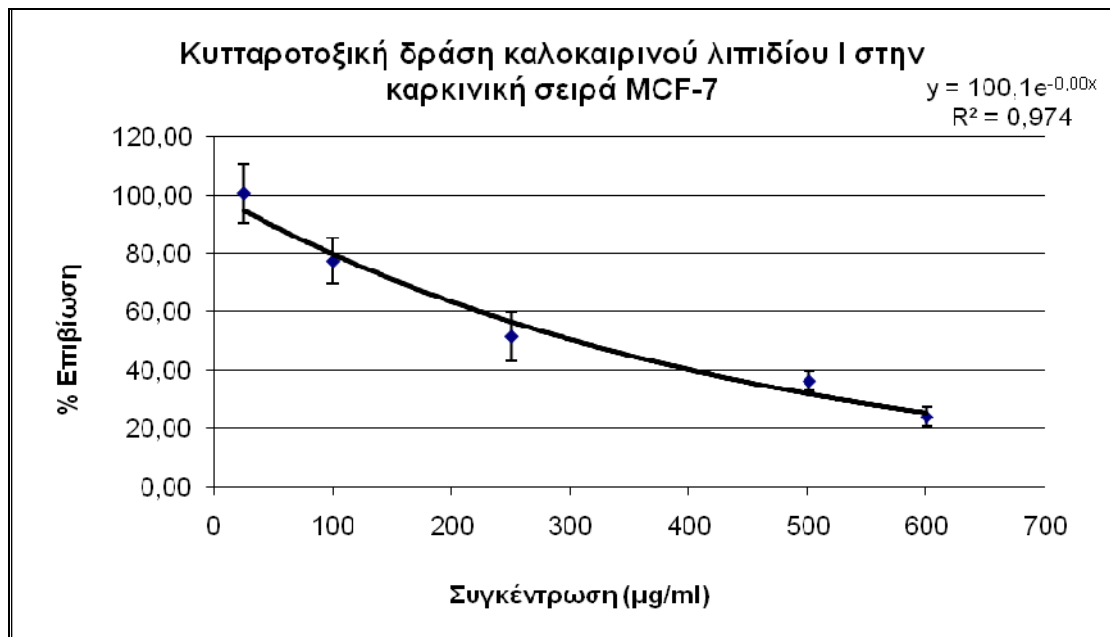
The tumor-bearing animals that were treated with the highest concentration of sclareol were more energetic than the other groups. Food intake and fecal excretion was physiological and stable in all the experimental groups. The water intake and urine output was physiological, except the second treatment group, where a statistically significant increased water uptake and urinary excretion was observed.

The growth rate of the tumor weight and the average weight of the tumor was higher in the control group compared with the two treatment groups. In addition, the average lifetime of the treatment animals was higher than the control group. At the end of the experimental procedure, 47% of the animals of the second treatment group which were survived sacrificed. Higher inhibition of tumor growth was observed in the first treatment group. Moreover, sclareol does not damage or alter the vital organs of the animals, while the 26% of the animals of the control group exhibited lung metastasis.

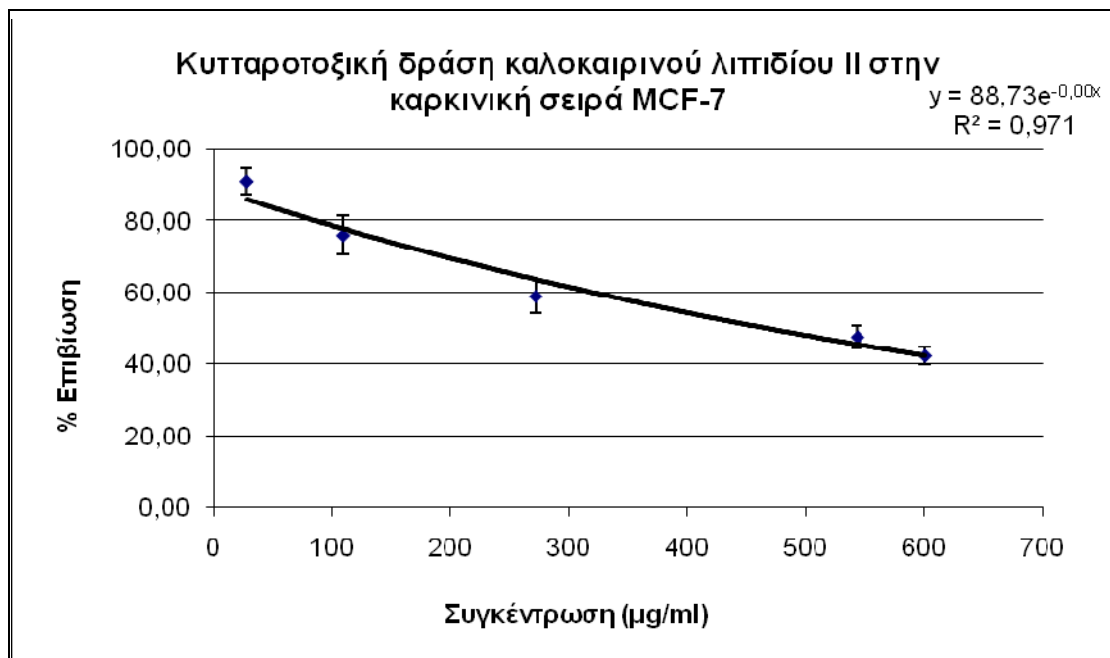
According to the above, the anticancer activity and the amount of the low molecular weight lipid constituents of the plant *Viscum album* depend on the time of harvesting. These results indicate that the adaptation mechanisms of the plant to prolonged cold invernial stress play an important role in its anticancer activity.

In addition, the diterpene sclareol, the structural analogue of the isolated lipid component of the plant *Viscum album*, exhibited high antitumor activities in all the cancer cell lines that were studied *in vitro* and provided promising outcomes *in vivo*. Since the anticancer drugs that are used nowadays cause various side effects due to their toxicity in the human body and the fact that they are costly, sclareol could be an effective antitumor agent. Due to its low toxicity and its low cost, it has substantial advantages if used as an anticancer drug. Moreover it is important to note that from a financial point of view, sclareol is a very competitive substance since it is found in abundance in nature.

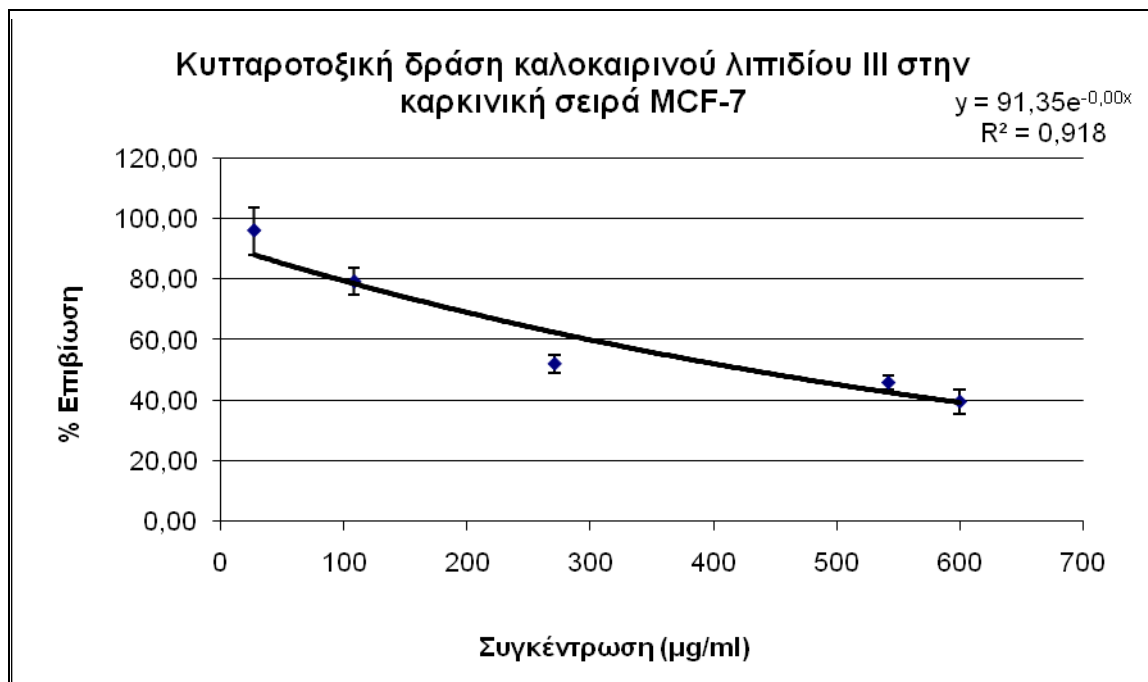
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



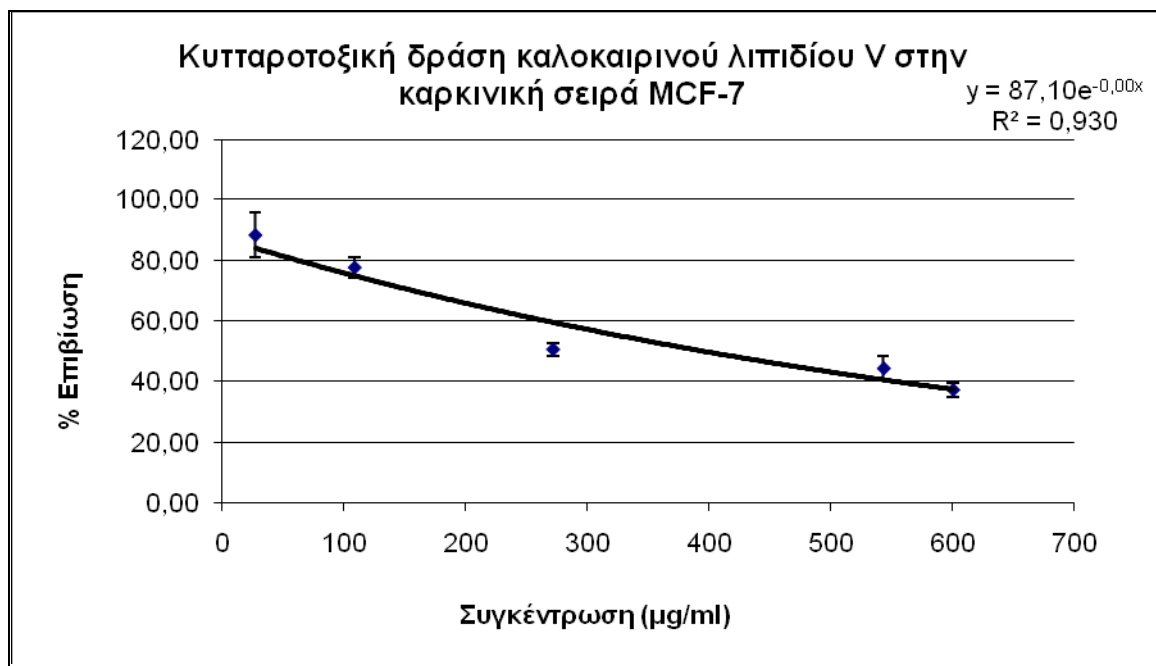
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου I στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,310 \pm 0,012 \text{ mg/ml}$.



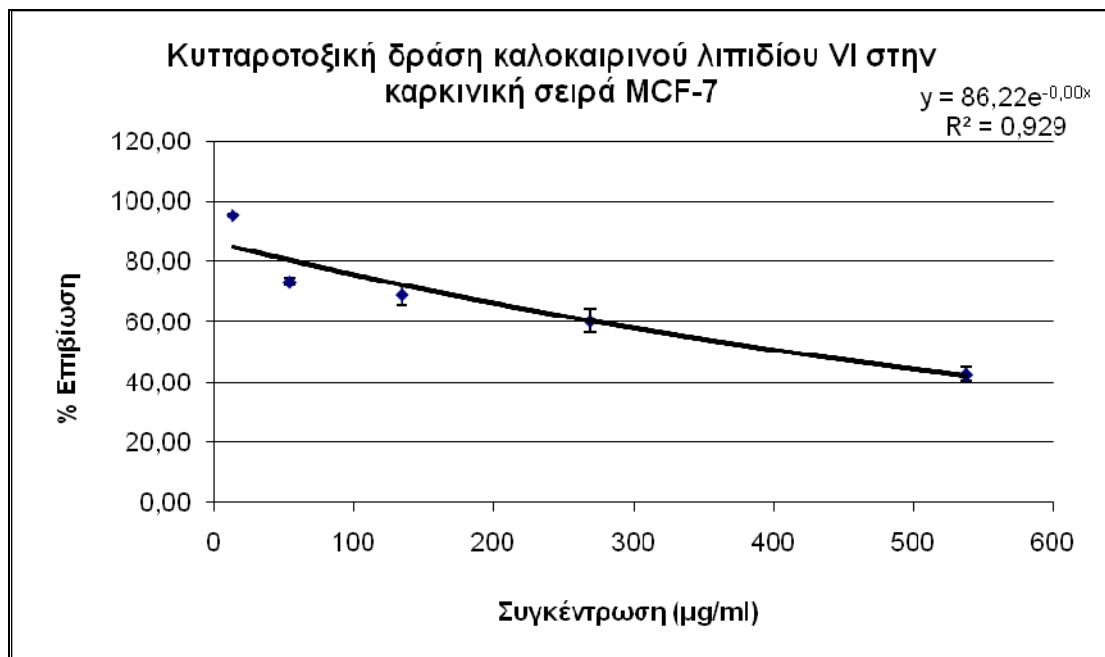
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου II στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,487 \pm 0,019 \text{ mg/ml}$.



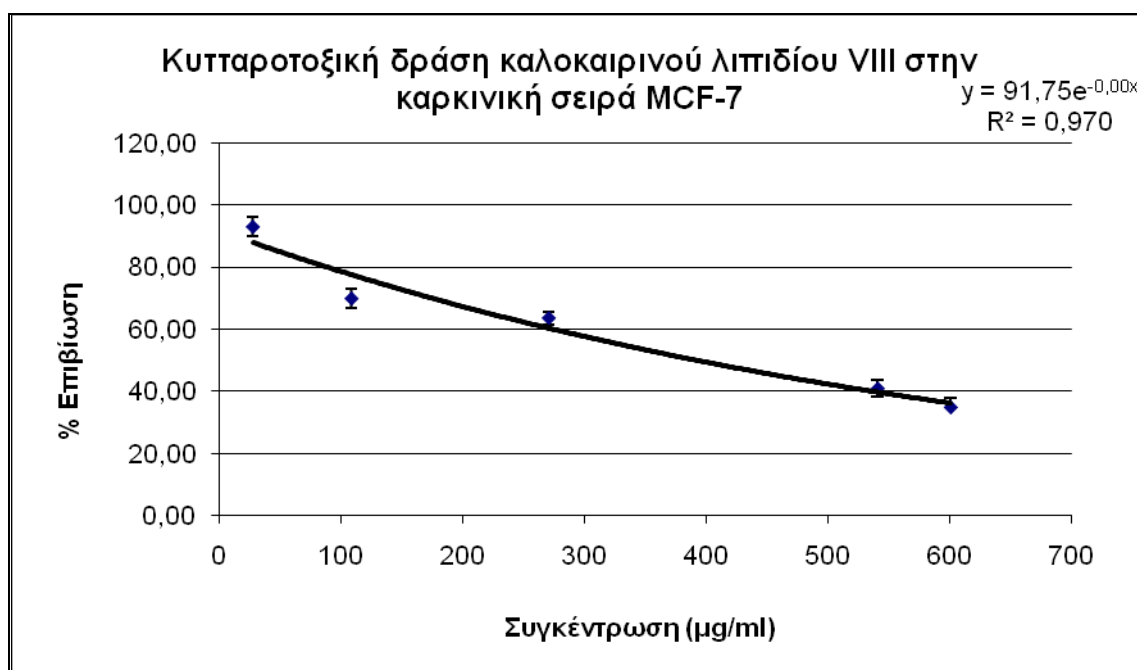
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου III στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,421 \pm 0,020 \text{ mg/ml}$.



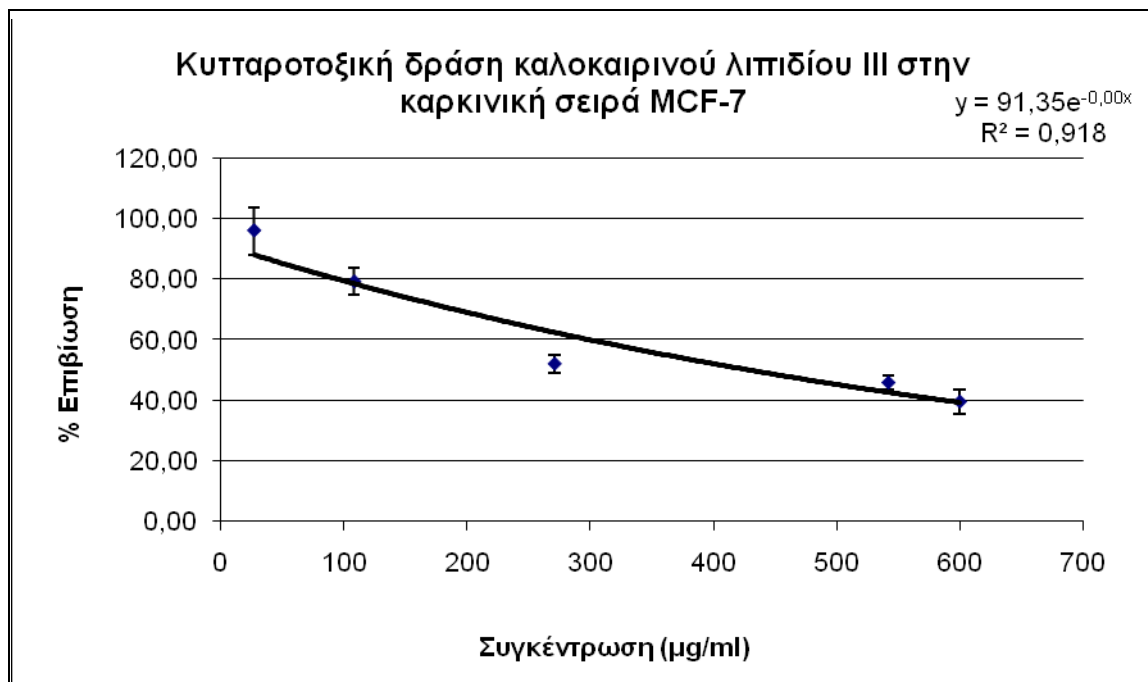
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου V στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,255 \pm 0,033 \text{ mg/ml}$.



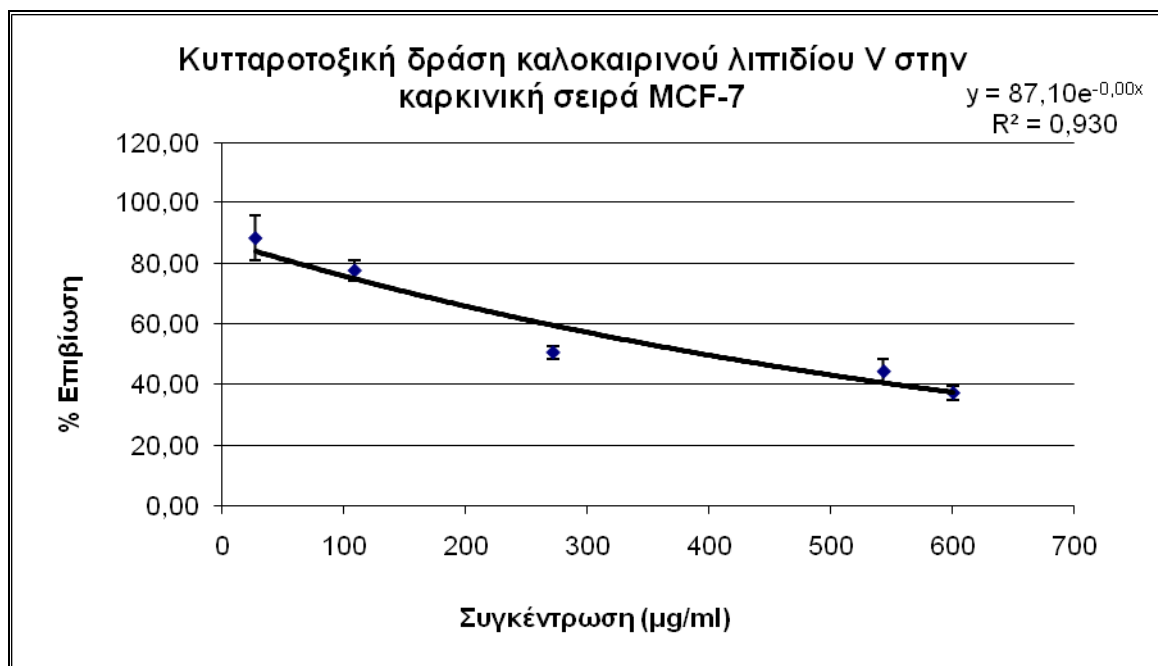
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου VI στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,362 \pm 0,017 \text{ mg/ml}$.



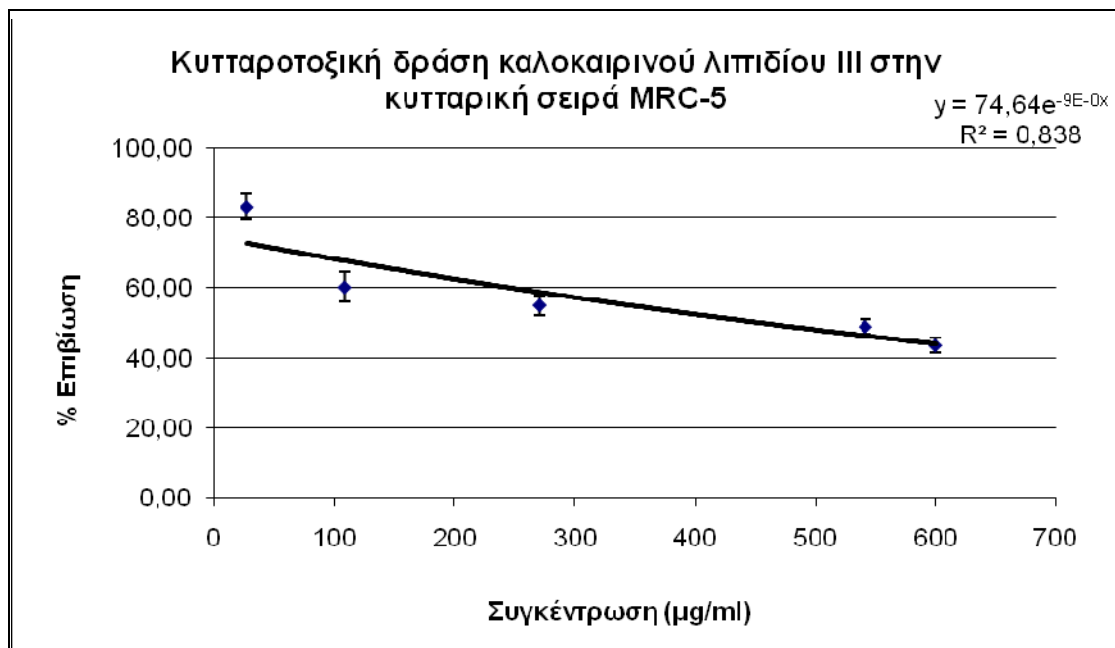
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου VIII στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,395 \pm 0,014 \text{ mg/ml}$.



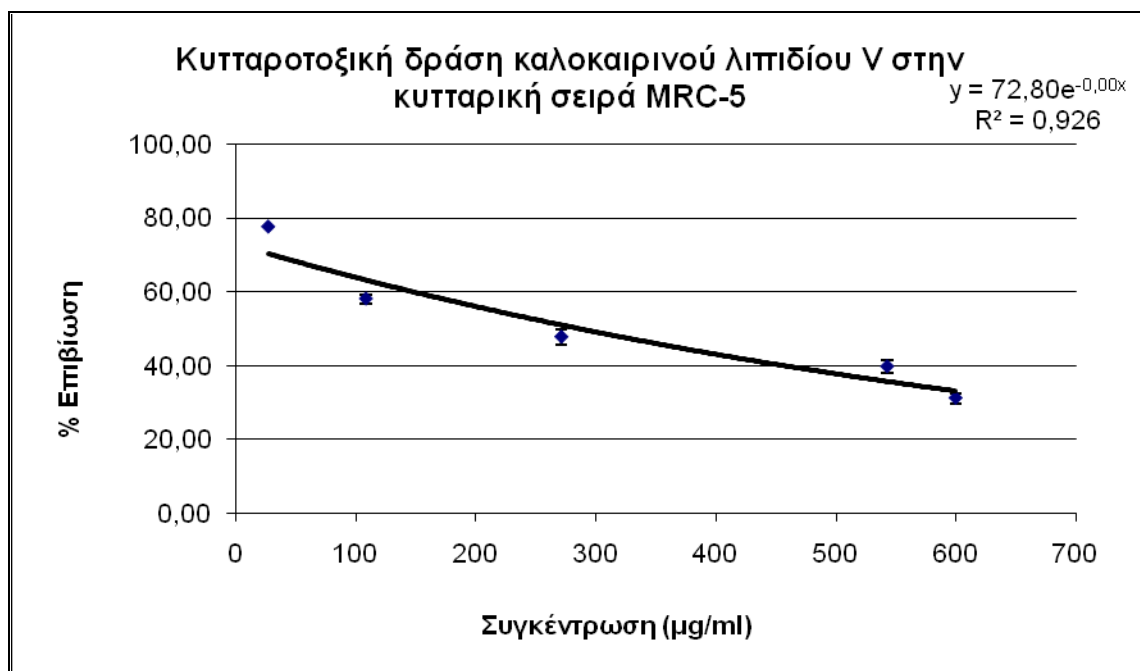
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου III στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,421 \pm 0,020 \text{ mg/ml}$.



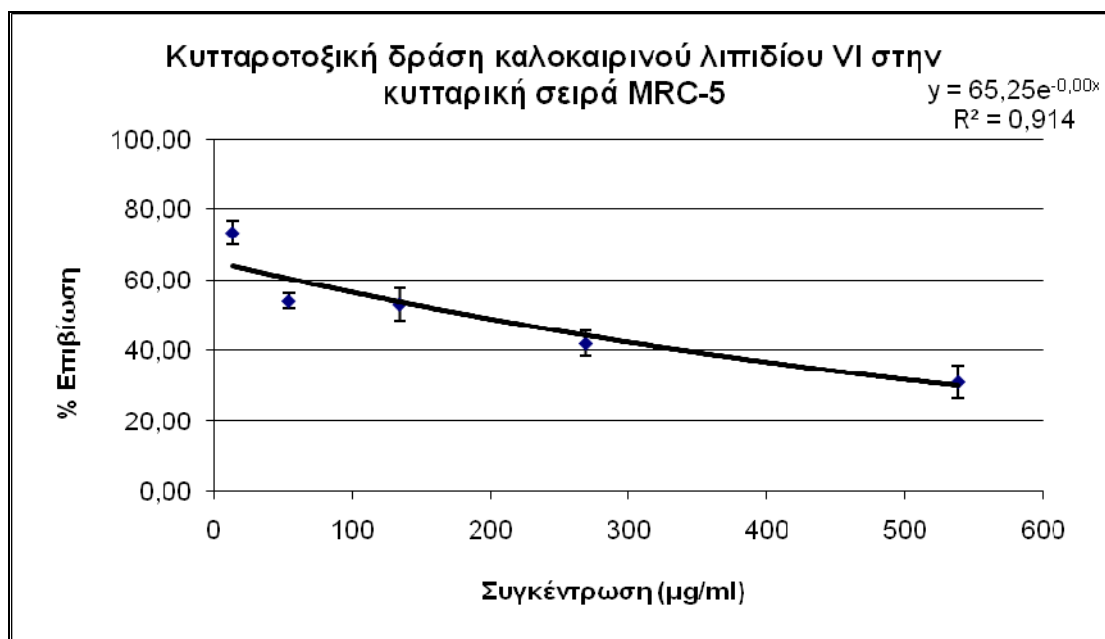
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου V στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,255 \pm 0,033 \text{ mg/ml}$.



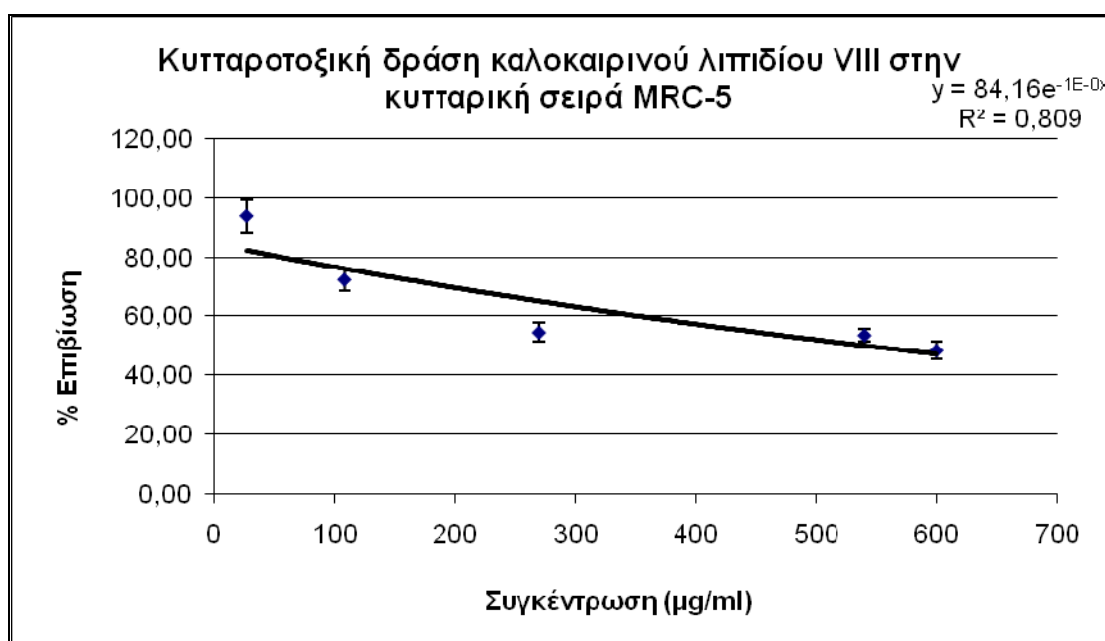
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου III στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,420 \pm 0,020$ mg/ml.



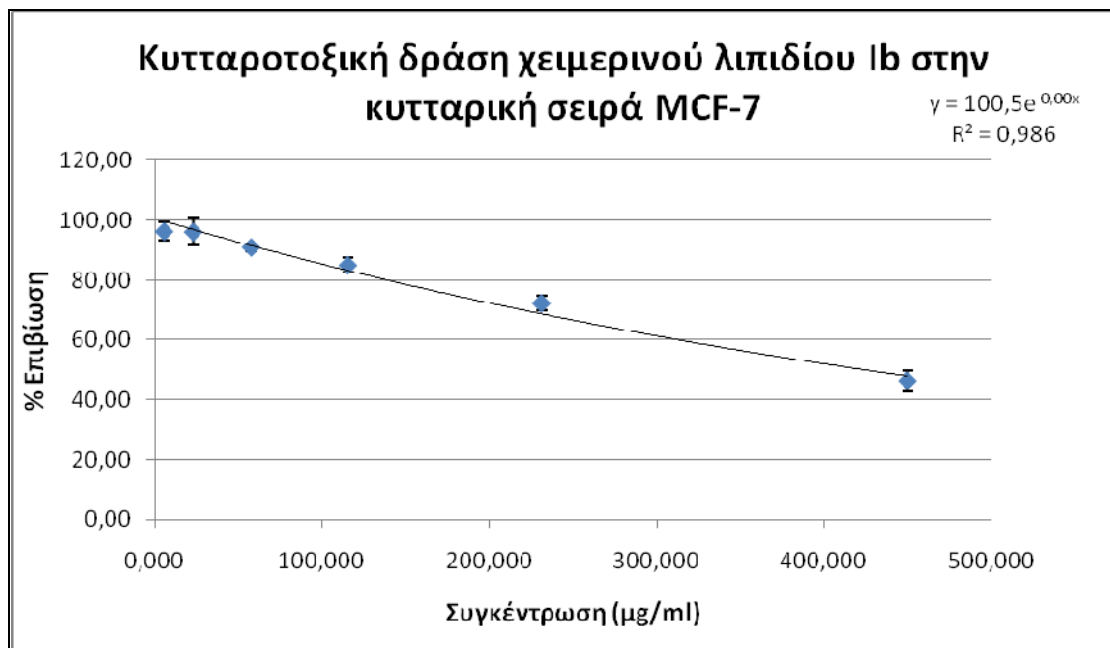
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου V στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,277 \pm 0,020$ mg/ml.



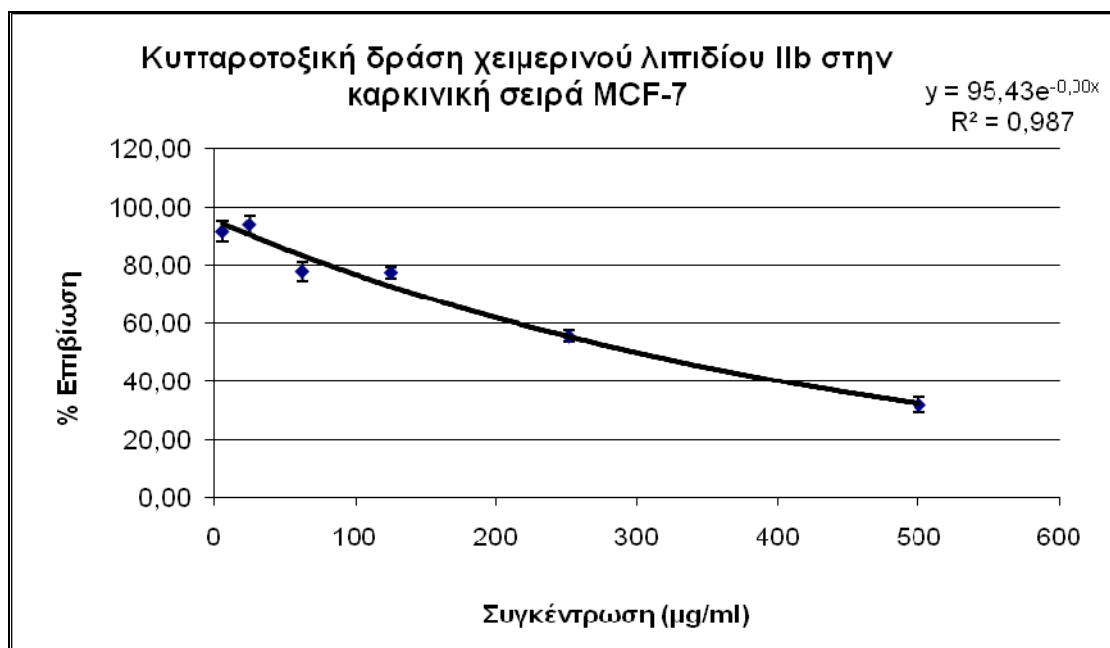
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου VI στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,169 \pm 0,018 \text{ mg/ml}$.



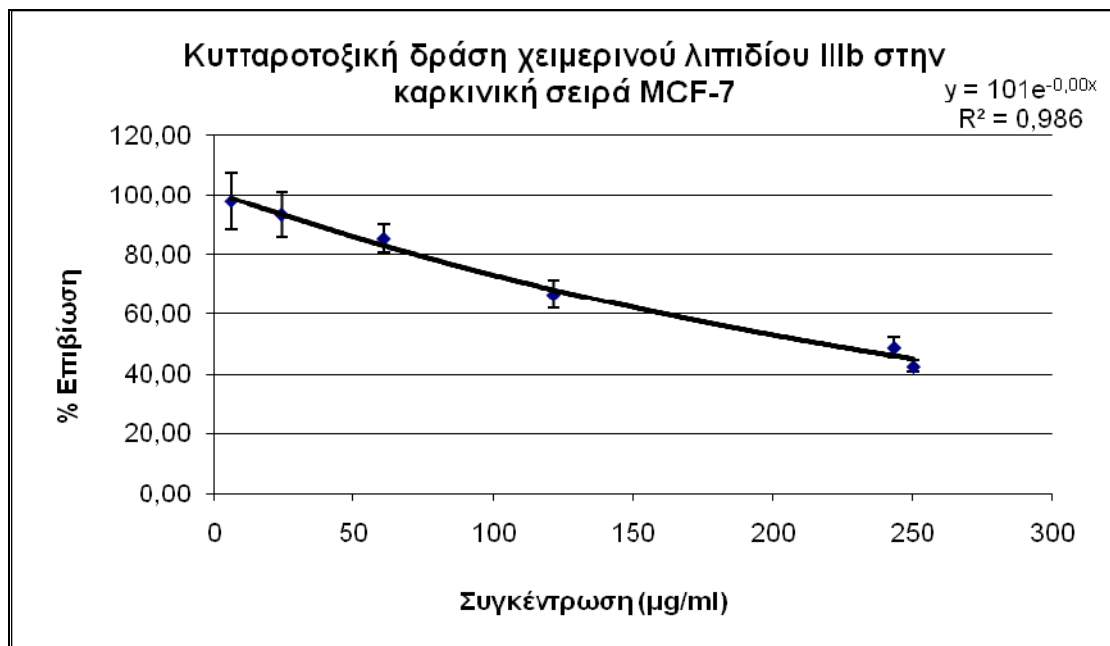
Κυτταροτοξική δράση καλοκαιρινού λιπιδίου VIII στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,511 \pm 0,019 \text{ mg/ml}$.



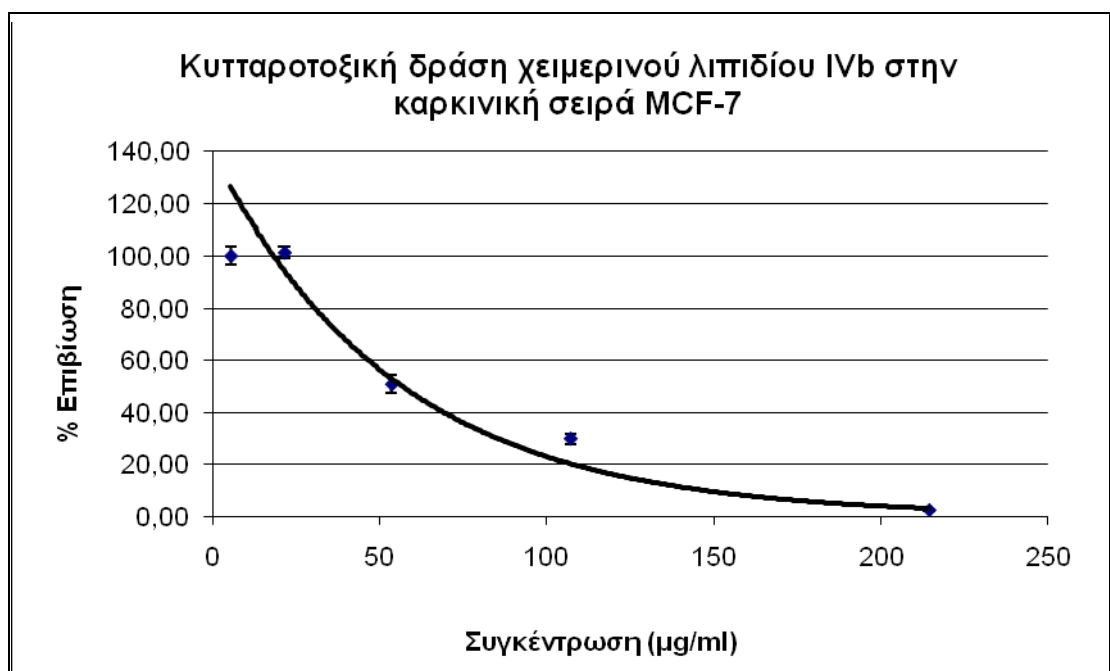
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου Ib στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,420 \pm 0,059$ mg/ml.



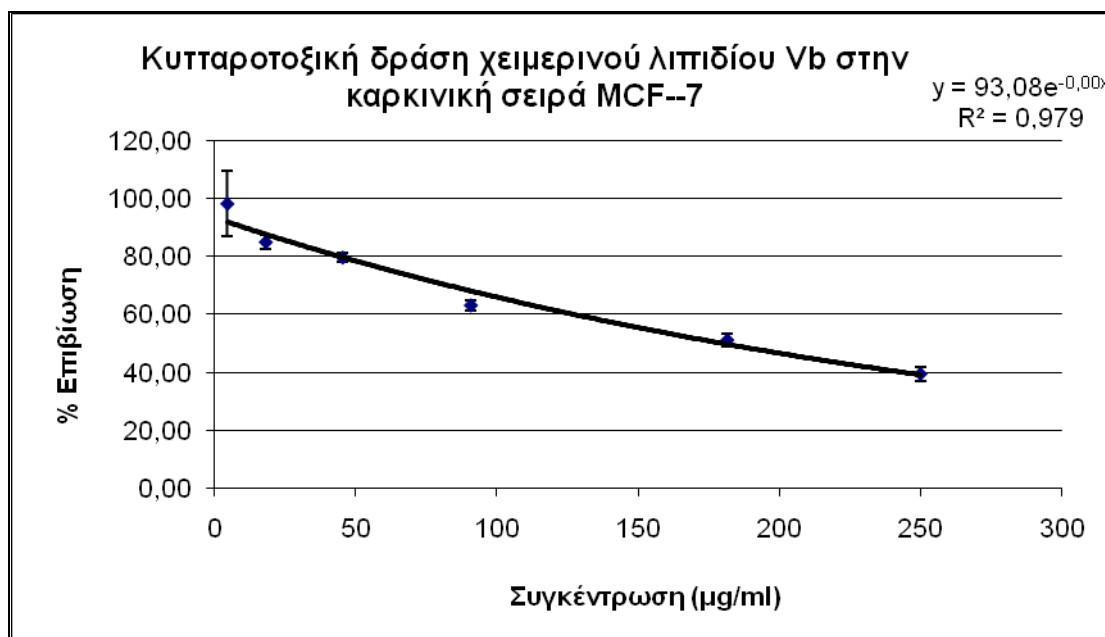
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IIb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,271 \pm 0,029$ mg/ml.



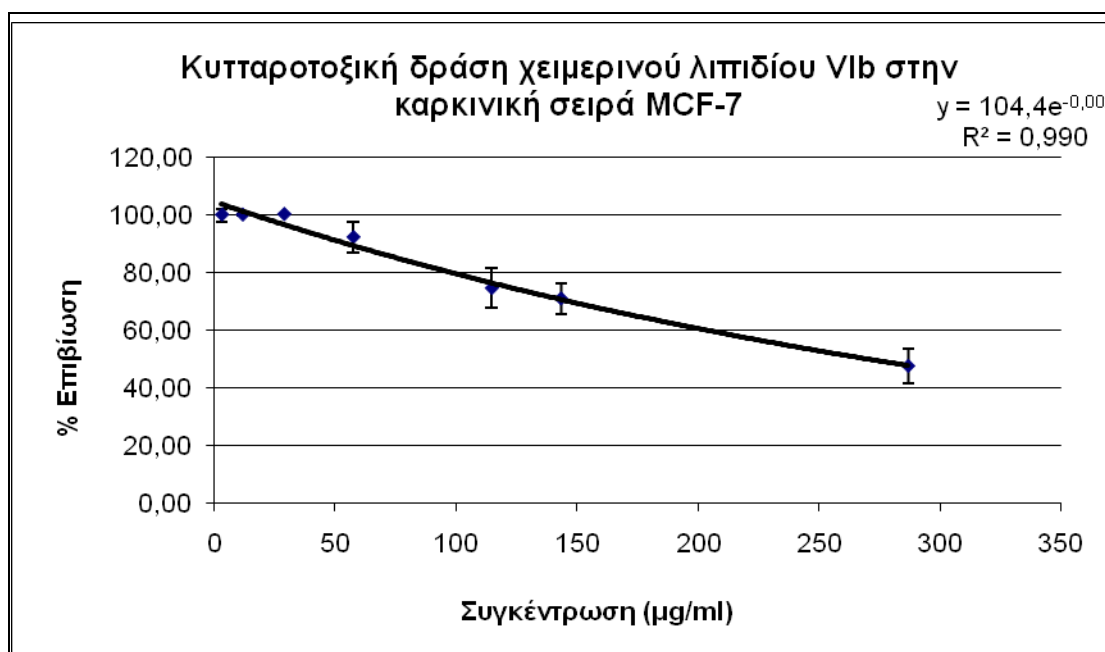
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IIIb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,242 \pm 0,022 \text{ mg/ml}$.



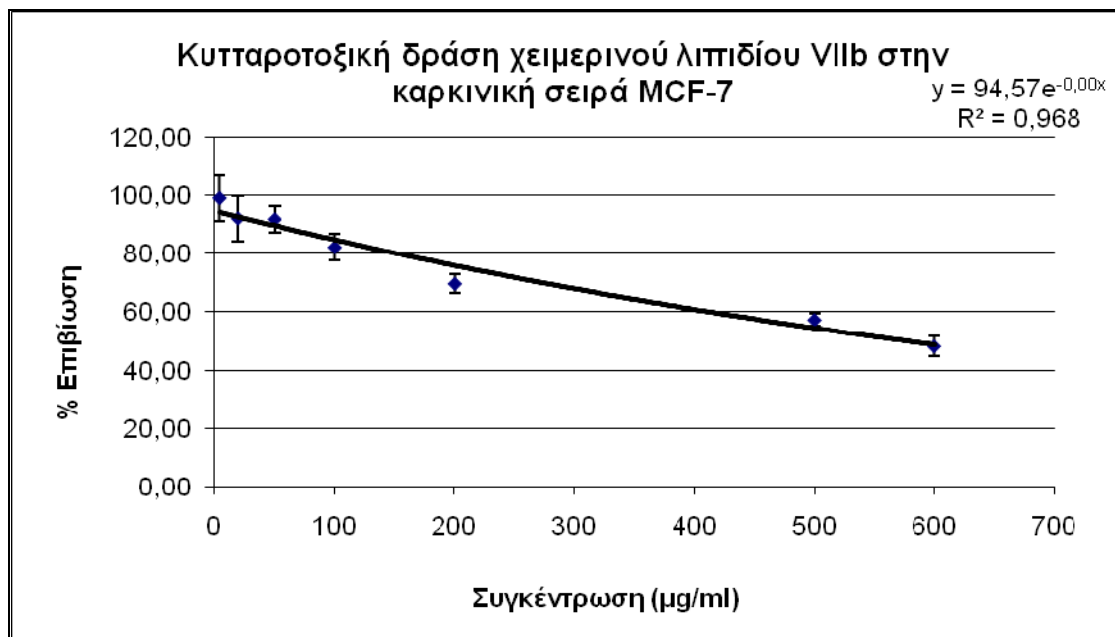
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IVb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,065 \pm 0,024 \text{ mg/ml}$.



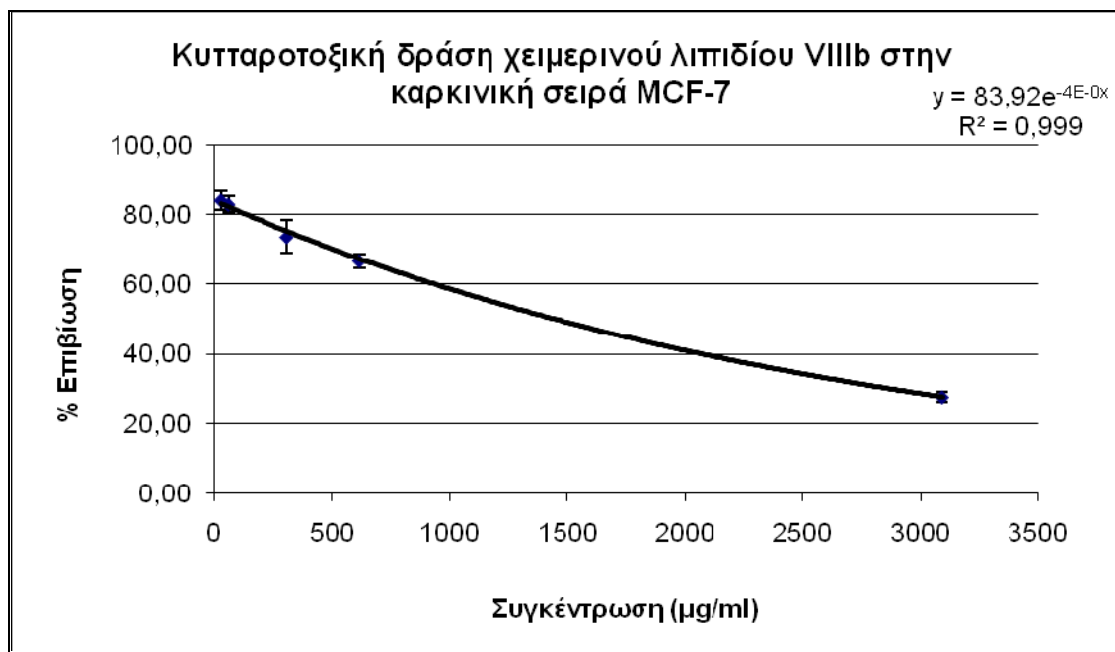
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου Vb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,160 \pm 0,017 \text{ mg/ml}$.



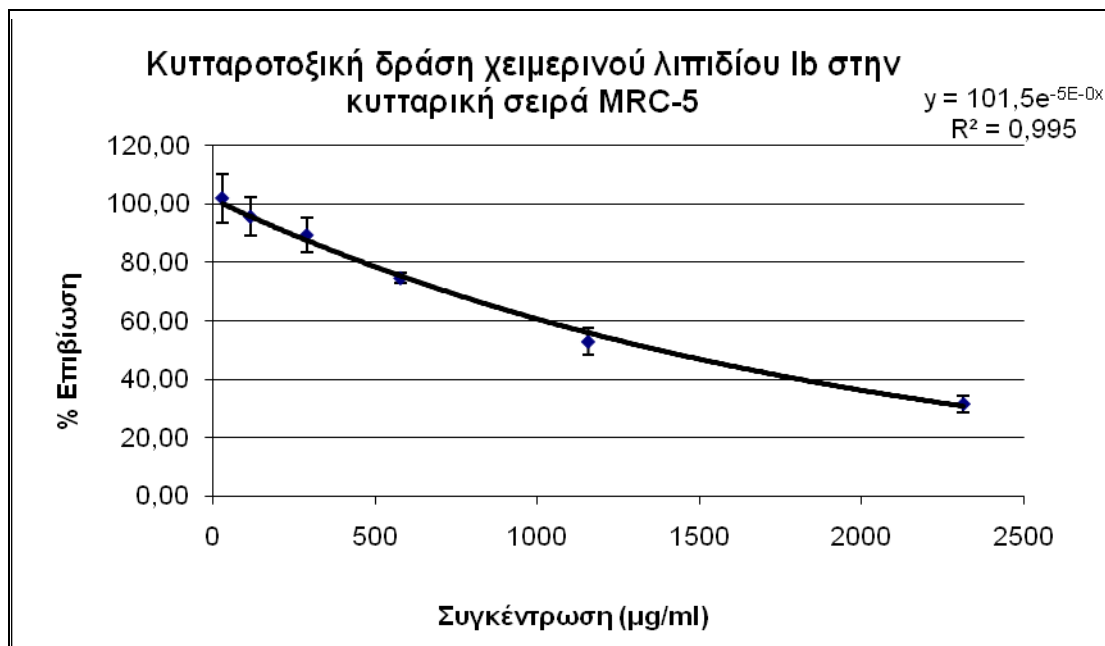
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,265 \pm 0,032 \text{ mg/ml}$.



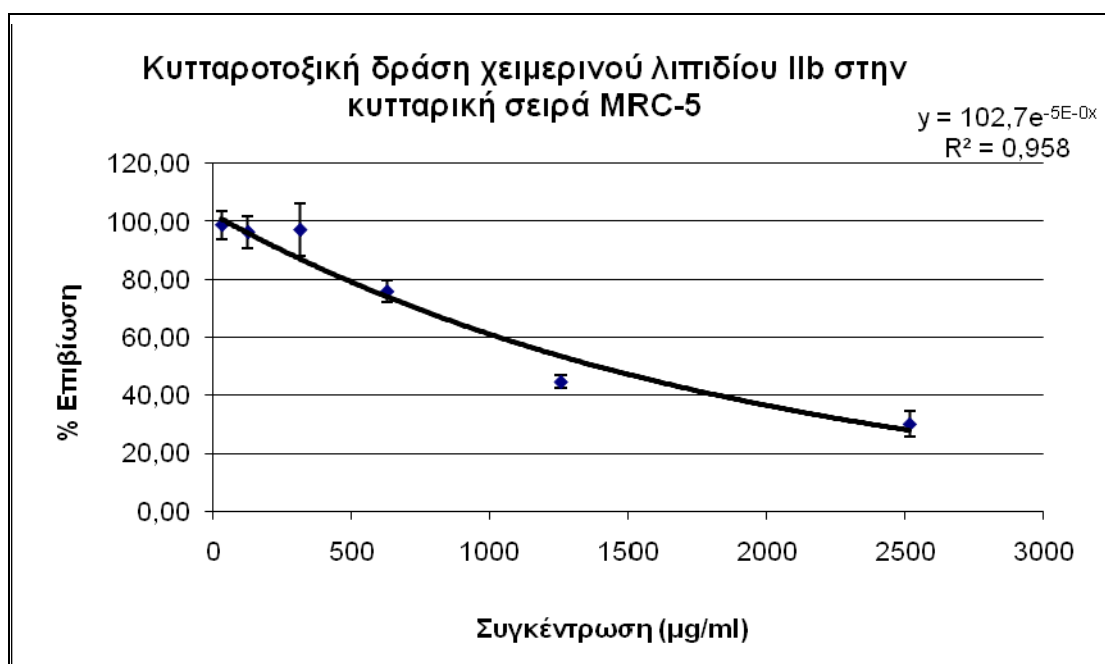
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIIb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $0,623 \pm 0,048 \text{ mg/ml}$.



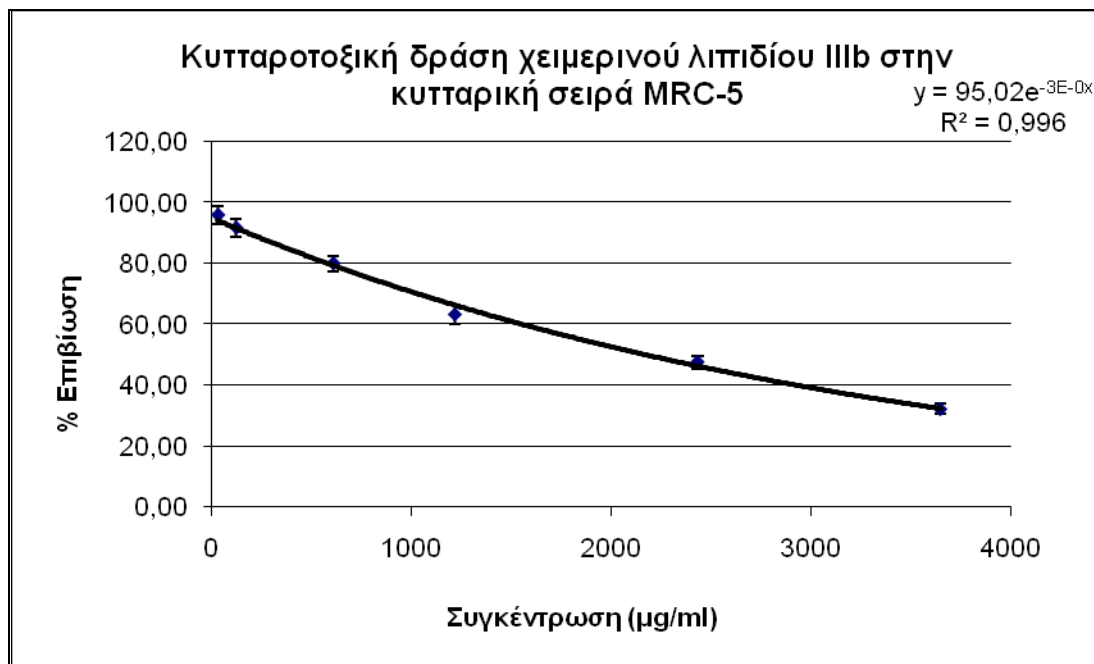
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIIIb στην κυτταρική σειρά MCF-7. Η τιμή IC_{50} είναι $1,393 \pm 0,039 \text{ mg/ml}$.



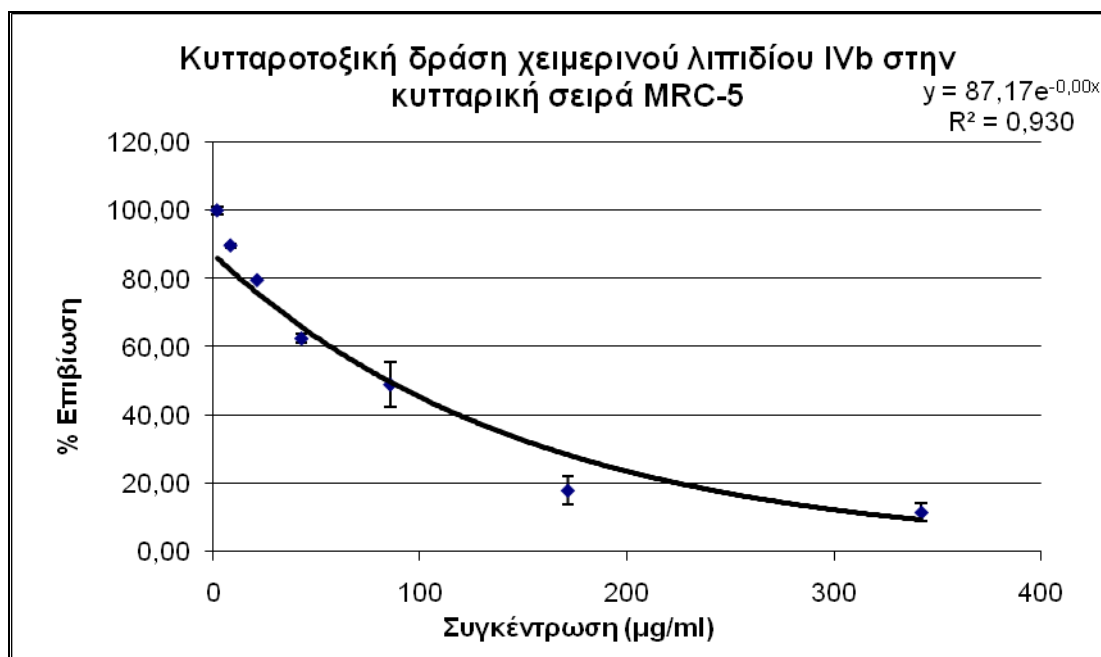
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου Ib στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $1,320 \pm 0,028 \text{ mg/ml}$.



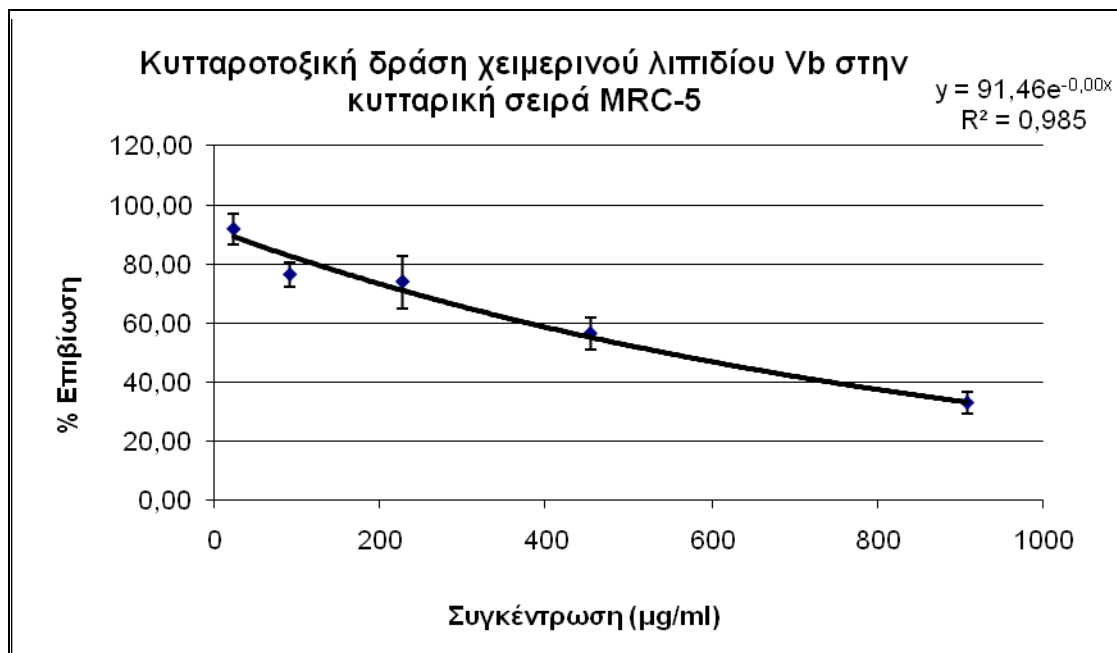
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IIb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $1,385 \pm 0,039 \text{ mg/ml}$.



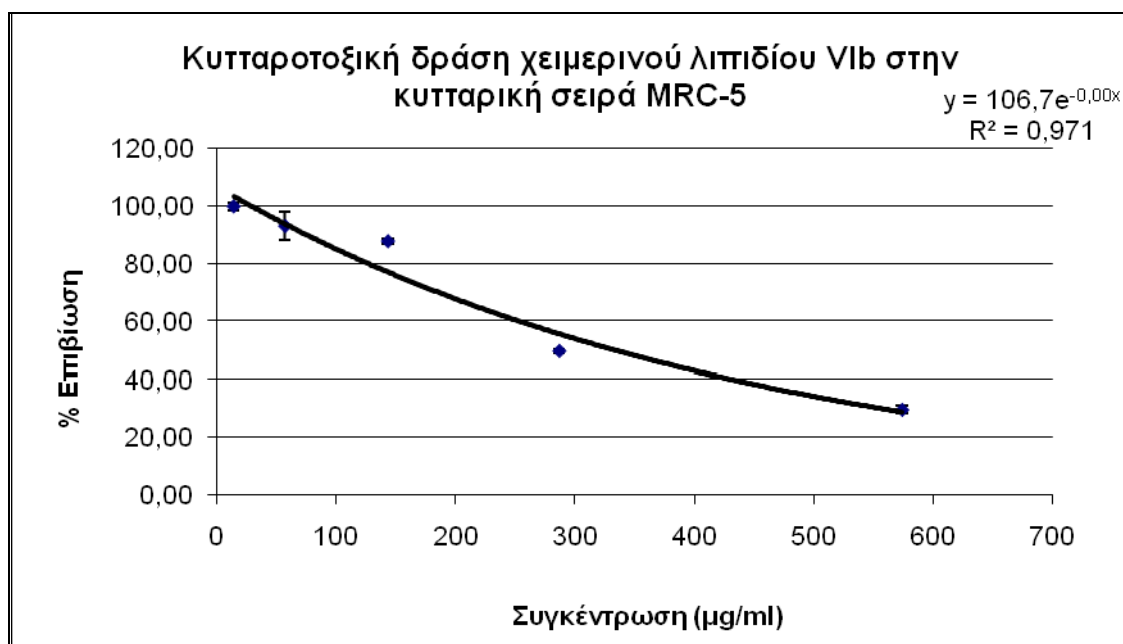
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IIIb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $2,159 \pm 0,037 \text{ mg/ml}$.



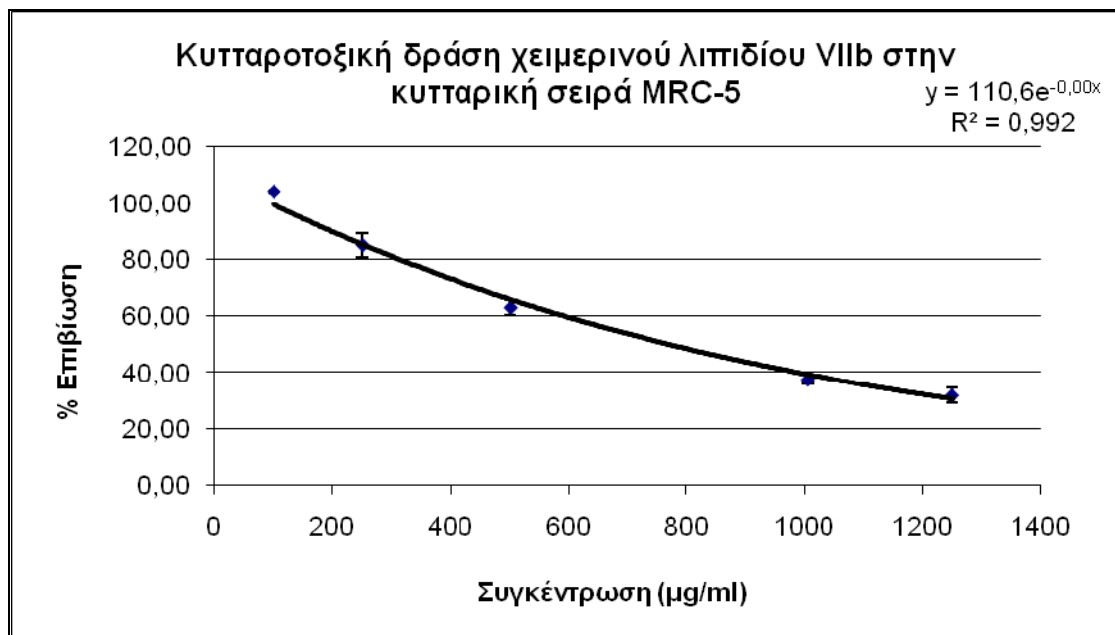
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου IVb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,088 \pm 0,036 \text{ mg/ml}$.



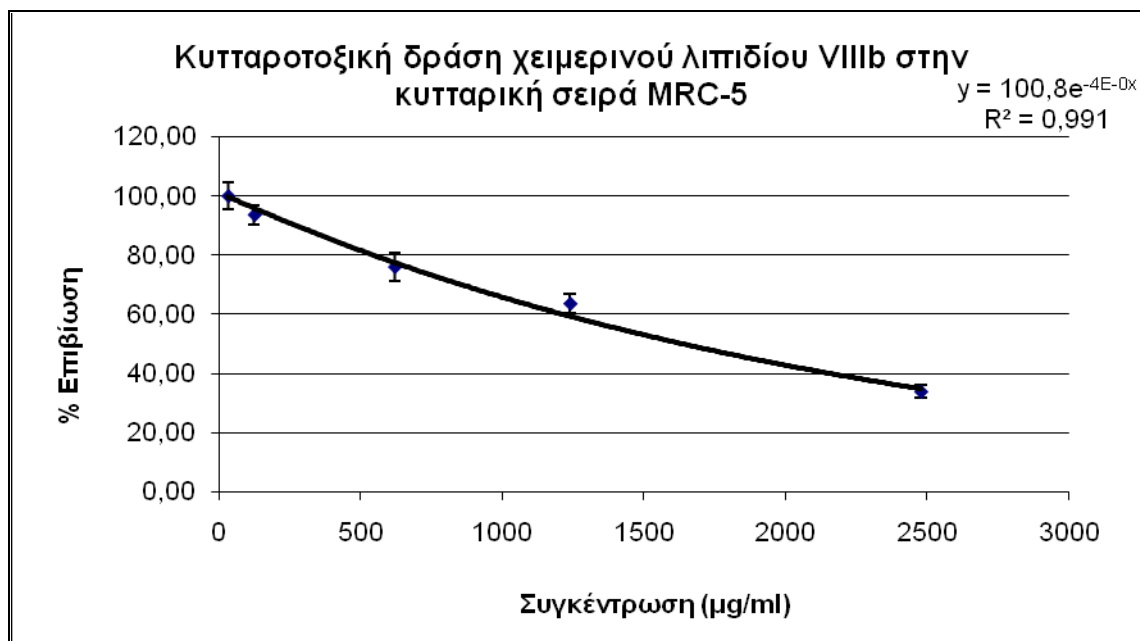
Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου Vb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,556 \pm 0,027 \text{ mg/ml}$.



Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,330 \pm 0,043 \text{ mg/ml}$.



Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIIb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $0,725 \pm 0,044 \text{ mg/ml}$.



Κυτταροτοξική δράση χειμερινού λιπιδίου VIIIb στην κυτταρική σειρά MRC-5. Η τιμή IC_{50} είναι $1,662 \pm 0,081 \text{ mg/ml}$.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akihisa T, Kojima N, Kikichi T et al. Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpenes cinnamates and acetates from Shea fat. *J. Oleo Sci.* **2010**, 59(6): 273-280
- Arianoutsou M, Groves RH, editors. Plant-animal interactions in mediterranean-type ecosystems, **1994**, 3-11
- Aukema JE, Martinez DRC. Where does a fruit-eating bird deposit mistletoe seeds? Seed deposition patterns and an experiment. *Ecology* **2002**, 83(12): 3489–3496
- Avcý G, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E, Kucukkurt I. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J Ethnopharmacol.* **2006**, 107: 418–423
- Awad AB, Fink CS. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J. Nutr.* **2000**, 130: 2127–2130
- Babu LH, Perumal S, Balasubramanian MP. Myrtenal, a natural monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem.* **2012**, 369: 183–193
- Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, Keyomarsi K, Yarden Y, Seger R. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* **2001**, 20:147-155
- Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Shao X, Pan MH, Bily A, Ho CT. Flavonoid glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and anti-inflammatory effects. *Fitoterapia* **2011**, 82: 168–172
- Bar-Sela G. White-Berry Mistletoe (*Viscum album* L.) as complementary treatment in cancer: Does it help? *Eur J Integ Med.* **2011**, 3: 55–62
- Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk *Environ. Health Perspect.* **1993**, 100: 9-20
- Baskar AA, Ignacimuthu S, Paulraj GM, Numair KSA. Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model – an *in vitro* and *in vivo* study. *Complem Altern Med.* **2010**, 10: 24
- Baumgart S, Ellenrieder V, Fernandez-Zapico EM. Oncogenic Transcription factors: cornerstones of inflammation-linked pancreatic carcinogenesis. *Gut.* **2013**, 62(2): 310–316.

- Belov VN, Skvortsova NI. Advances in the synthesis of perfumes possessing an isoprenoid structure. *Rus Chem Rev.* **1963**, 32(3)
- Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on sclareol. *Food Chem Toxicol.* **2008**, 46: 270–274
- Blankenberg GF, Strauss HW. Recent advances in the molecular imaging of programmed cell death: Part I—Pathophysiology and Radiotracers. *J. Nuclear Med.* **2012**, 53(11):1659-62
- Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol.* **2013**, 15(2): 126-134
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **1959**, 37: 911-917
- Braedel-Ruoff S. Immunomodulatory Effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: Review of clinical trials. *Forsch Komplementmed* **2010**, 17: 63–73
- Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukenda D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, Balijs M. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* **2012**, 17(1):10-5
- Brandenberger M, Simões-Wüst AP, Rostock M, Rist L, Saller R. An exploratory study on the quality of life and individual coping of cancer patients during mistletoe therapy. *Integr Cancer Ther.* **2011**, 1-11
- Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem. J.* **2013**, 450: 253–264
- Büssing A, editor, Mistletoe, the genus *Viscum*, medicinal and aromatic plants-Industrial profiles, **2000**, 16(8): 101-117
- Büssing A, Regnery A, Schweizer K. Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression *Cancer Lett.* **1995**, 94: 199-205
- Büssing A, Suzart K, Bergmann J, Pfüller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* **1996**, 99: 59-72
- Büssing A, Gerburg SM., Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human

- lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 262: 79-87
- Büssing A, Wagner M, Wagner B, Stein GM, Schietzel M, Schaller G, Pfüller U. Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album* L. *Cancer Lett* **1999**, 139: 79-88
- Büssing A, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfüller U, Schietzel M. Expression of mitochondrial apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* **1999**, 37: 133–139
- Cagatay G, Lenhard R. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* **2013**, 152: 390-393
- Cazacu M, Oniu T, Lungoci C, Mihailov A, Cipak A, Klinger R, Weiss T, Zarkovic N. The influence of isorel on the advanced colorectal cancer. *Cancer Biother Radiopharm.* **2003**, 18(1):.27-34
- Cebovic T, Spasic S, Popovic M. Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells in vivo. *Phytother Res.* **2008**, 22: 1097–1103
- Cengiz T, Harun B, Zerrin A. Nutritional relationships between hemi-parasitic mistletoe and some of its deciduous hosts in different habitats. *Biologia* **2010**, 65(5): 859—867
- Chadburn A, Anmaar MAN, Bryan ST, Amy AL, Lymphoid proliferations associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Pathol Lab Med.* **2013**, 137: 360-370
- Chen L, Wu JB, Lei F, Qian S, Hai L, Wu Y. Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as antitumor agents. *J Asian Nat Prod Res.* **2012**, 14(4): 355-363
- Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroent.* **2012**, 143: 550–563
- Choudhary MI, Maher S, Begum A, Abbaskhan A, Ali S, Khan A et al. Characterization and antiglycation activity of phenolic constituents from *Viscum album* (European Mistletoe). *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58(7): 980-982

- Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer, *Br. J. Cancer* **1991**, 64: 631-644
- Coulon A, Mosbah A, Lopez A, Sautereau AM, Schaller G, Urech K, Rouge P, Darbon H, Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures *Biochem. J.* **2003**, 374: 71–78
- Çulhaoğlu B, Yapar G, Dirmenci T, Topçu G. Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf. *Nat Prod Res.* **2013** 27(4-5): 438-447
- Cullen J, editor, The European garden flora III, 121, Cambridge University Press
- De Palma M, Claire EL. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **2013**, 23(18): 277-286
- Degenhardt J, Kollner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **2009**, 70: 1621–1637
- Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ. A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif.* **2012**, 45: 176–187
- Deliormana D, Calis I, Ergun F, A new acyclic monoterpene glucoside from *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* **2001**, 72: 101-105
- Didem DO, Mustafa A, Nilufer S, Fatma E, Erdem Y. Evaluation of the hypoglycemic effect and antioxidant activity of three *Viscum album* subspecies (European mistletoe) in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* **2005**, 98: 95–102
- Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, Vaos B, Marselos M, Malamas M, Tzavaras T. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res.* **1999**, 23: 217–234
- Dimas K, Demetzos C, Vaos V, Ioannidis P, Trangas T. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of *c-Myc* protein, but not of *Bcl-2*, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. *Leuk Res.* **2001**, 25: 449–454
- Dimas K, Papadaki M, Tsimplouli C et al. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacoth.* **2006**, 60: 127–133

- Dimas K, Hatziantoniou S, Tseleni S, Khan H, Georgopoulos A, Alevizopoulos K, Wyche JH et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells *in vitro* and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis* **2007**, 12: 685–694
- Dixon DA, Blanco FF, Bruno A, Patrignani P. Chapter 2: Mechanistic aspects of COX-2 expression in colorectal neoplasia, *Cancer Res.* **2013**, 191: 7–37
- Doehmer J, Eisenbraun J. Assessment of extracts from mistletoe (*Viscum album*) for herb–drug interaction by inhibition and induction of cytochrome P450 activities *Phytother. Res.* **2011**
- Drury S, editor. Customs and Beliefs Associated with Christmas Evergreens: A Preliminary Survey. *Folklore* **1987**, 98(2): 194-199
- Eggenschwiler J, Leopold vB, Stritt B, Pruntsch D, Mac R, Urech K, Rist L, Simões-Wüst P, Viviani A. Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement Altern Med.* **2007**, 7: 14
- Eisenreich W, Bachera A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61: 1401–1426
- Elluru SR, Duong van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Friboulet A, Kaveri SV, Bayry J. Induction of maturation and activation of human dendritic cells: A mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer* **2008**, 8:161
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **2007**, 35(4): 495–516
- Escher P, Eiblmeier M, Hetzger I, Heinz R. Seasonal and spatial variation of carbohydrates in mistletoes (*Viscum album*) and the xylem sap of its hosts (*Populus euamericana* and *Abies alba*). *Physiol Plant* **2004**, 120: 212–219
- Faulkes A, trans. Edda, *Everyman*. ISBN 0-460-87616-3, **1995**, 48-49.
- Fekih A, Gafsi K, Ferreiro-Mederos L, Hanquet G. Hemisynthesis of new labdane derivatives from (-)-sclareol. *Nat Prod Res.* **2006**, 20(10): 887-895
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, 246: 64-71

- Ferreiro-Mederos L, Lanners S, Henchiri H, Fekih A, Hanquet G. Hemisynthesis of two marine cheilanthane sesterterpenes from (-)-sclareol: First enantioselective synthesis of petrosaspongiolide R. *Nat Prod Res.* **2009**, 23(3): 256-263
- Fidan I, Ozkan S, Gurbuz I, Yesilyurt E et al. The efficiency of *Viscum album ssp. album* and *Hypericum perforatum* on human immune cells *in vitro*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008, 30: 519-528
- Frija LMT, Frade RFM, Afonso CAM. Isolation, chemical and biotransformation routes of labdane-type diterpenes. *Chem. Rev.* **2011**, 111: 4418–4452
- Fu LL, Zhou CC, Yao S, Yu JY, Liu B, Bao JK. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol.* **2011**, 43: 1442–1449
- Gabrilovich ID, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* **2013**, 12(4): 253–268
- Galanos DS, Kapoulas VM. Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *J Lipid Res.* **1962**, 3: 134-136
- Gardin NE. Immunological response to mistletoe (*Viscum album L.*) in cancer patients: A four-case series. *Phytother. Res.* **2009**, 23: 407–411
- Garkoti SC, Akoijam SB, Singh SP. Ecology of water relations between mistletoe (*Taxillus vestitus*) and its host oak (*Quercus floribunda*). *Tropic. Ecol.* **2002**, 43: 243–249.
- Giudici M, Pascual R, Canal L, Pfuller K, Pfuller U, Villalain J. Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: Implications to their mechanism of action. *Biophys Journal* **2003**, 85: 971–981
- Gomes FG, Fernanda N, Alessandro MA, Jacques EN, Sandra BCT. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci.* **2013**, 92: 101–107
- Gomez-Flores R, Quintanilla-Licea R, Verde-Star MJ, Morado-Castillo R et al. Long-chain alkanes and ent-labdane-type diterpenes from *Gymnosperma glutinosum* with cytotoxic activity against the murine lymphoma L5178Y-R. *Phytother. Res.* **2012**, 26: 1632–1636
- Gónnewich N, Higashi Y, Feng X, Choi KB, Schmidt J, Kutchan TM. A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of

- geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate. *Phytochemistry* **2012**
- Gradishar WJ. Taxanes for the treatment of metastatic breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clin Res.* **2012**, 6
- Graham W, editor. Macmillan. *Bella Poldark*. **2002**, 6
- Greene E. R., Huang S., Serhand C., Panigrahy D., Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostagl. Lip. Med.* **2011**, 96: 27– 36
- Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, 29(3): 405–434
- Gupta G, Kazmi I, Afzal M, Rahman M, Saleem S, Ashraf S, Khusroo JM, Nazeer K, Ahmed S, Anwar F. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Viscum album* L. (Loranthaceae) in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* **2012**, 1-7
- Hajtó T, Hostanska K, Berki T, Pálinkás L, Boldizsár F, Németh P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): Overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. *eCAM* **2005**, 2(1): 59–67
- Hajto T, Fodor K, Perjesi P, Nemeth P. Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine. *eCAM* **2009**, 1-6
- Hatziantoniou S, Dimas K, Georgopoulos A, Sotiriadou N, Demetzos C. Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. *Pharmacol Res.* **2006**, 53: 80–87
- Hartman LM, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Lett.* **2013**, 331: 24–34
- He XG, Liu RH. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55: 4366-4370
- Hegde P, Maddur SM, Friboulet A, Bayry J, Kaveri VS. *Viscum album* exerts anti-inflammatory effect by selectively inhibiting cytokine-induced expression of cyclooxygenase-2. *PLoS One* **2011**, 6(10): 26312

- Heinz Z, Bergmann L, Fiebig H, Aamdal S, Schoffski P, Witthohn K, Lentzen H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: A potential anticancer drug. *Eur J Cancer*. **2011**, 47: 1450–1457
- Heinzerling L, Bayer VV, Liebenhal C, Rudiger VB, Volk HD. Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes in vitro, *ex vivo*, and *in vivo*. *J. Clini Immunol*. **2006**, 26(4): 347-359
- Horneber M, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. **2010**, 2:1-92
- Huang GJ, Pan CH, Wu CH. Sclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the λ -carrageenan-induced paw edema model. *J. Nat. Prod*. **2012**, 75: 54–59
- Huber R, Eisenbraun J, Miletzki B, Adler M, Scheer R, Klein R, Gleiter HC. Pharmacokinetics of natural mistletoe lectins after subcutaneous injection *Eur J Clin Pharmacol*. **2010**, 66: 889–897
- Hudes GR, Szarka CE, Adams A et al. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clin Cancer Res*. **2000**, 6: 3071-3080
- Ibanez S, Gallet C, Després L. Plant insecticidal toxins in ecological networks. *Toxins* **2012**, 4: 228-243
- Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys*. **1976**, 64: 2237-2294
- Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* **2001**, 36(11): 1283-1287
- Jager S, Winkler K, Pfuller U, Scheffler A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plants extracts of *Viscum album L*. *Planta Med*. **2007**, 73: 157-162
- Jaiswal M, Larusso NF, Gores GJ. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2001**, 281: 626–634

- Janakat S, AL-Thnaibat O. Antilipoperoxidative effect of three edible plants extracts: *Viscum album*, *Arum dioscoridis* and *Eminium spiculatum*. *J Food Qual.* **2008**, 31: 1–12
- Jiao M, Li XW. Telomere and telomerase in oncology. *Cell Res.* **2002**, 12(1): 1-7
- Juan ME, Planas JM, Ruiz-Gutierrez V, Danie H, Wenzel U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br J Nutr.* **2008**, 100: 36–43
- Jung ML, Baudino S, Ribereau-Gayon G, Beck JP, Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.) *Cancer Lett.* **1990**, 51:103- 108
- Jung M, Ko I, Lee S, Choi SJ, Youn BH, Kim SK. A concise synthesis and *in vitro* cytotoxicity of new labdane diterpenes. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, 8: 3295-3298
- Kaegi E. Unconventional therapies for cancer: 3. Iscador. *CMAJ* **1998**, 158 (9)
- Kalland KH, Xi-Song K, Anne MQ. Tumour virology-history, status and future challenges. *Apmis.* **2009**, 117: 382–399
- Kanterman J, Sade-Feldman M, Baniyash M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Semin Cancer Biol.* **2012**, 22: 307-318
- Karagoz A, Onay E, Arda N, Kuru A. Antiviral potency of mistletoe (*Viscum album* ssp. *album*) extracts against human parainfluenza virus type 2 in vero cells. *Phytother. Res.* **2003**, 17: 560–562
- Kartoolinejad D, Hosseini SM, Mirnia S., Akbarinia M, Shayanmehr F. The relationship among infection intensity of *Viscum album* with some ecological parameters of host trees. *Int. J. Environ. Res.* **2007**, 1(2): 143-149
- Kashoury SA, Askary HI, Kandil ZA, Salem MA, Sleem AA. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Mentha suaveolens* Ehrh. *Plant Foods Hum Nutr.* **2012**, 67(4): 344-50
- Kaur P, Chaudhary A, Singh RD, Gopichand, Prasad R, Singh B. Spatial and temporal variation of secondary metabolite profiles in Ginkgo biloba leaves *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (China journal of Chinese materia medica)* **2011**, 36(14): 1941-41
- Keawsard S, Liawruangrath B, Liawruangrath S, Teerawutgulrag A, Pyne SG. Chemical constituents and antioxidant and biological activities of the essential oil from leaves of *Solanum spirale*. *Nat Prod Commun.* **2012**, 7(7): 955-8

- Khil LY, Kim W, Lyu S, Park WB, Yoon JW, Jun HS. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J Gastroenterol.* **2007**, 13(20): 2811-2818
- Kienle GS, Glockmann A, Schink M, Kiene H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J. Exp.Clin. Cancer Res.* **2009**, 28:79
- Kienle GS, Kiene H. 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**, 9(2): 142–157
- Kienle GS, Grugel R, Kiene H. Safety of higher dosages of *Viscum album* L. in animals and humans - systematic review of immune changes and safety parameters. *BMC Complement Altern Med.* **2011**, 11:72
- Kim MS, Lee J, Lee KM, Yang SH, Choi S, Chung SY, Kim TY, Jeong WH, Park R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci.* **2003**, 73: 1231–1243
- Kim WH, Park WB, Gao B, Ho JM. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol Pharmacol.* **2004**, 66: 1383–1396,
- Kintzios ES. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Crit Rev Plant Sci.* **2006**, 25: 79–113,
- Kipanyula MJ, Faustin SEP, Vecchio L, Farahna M, Nchiwan NE, Hervé NKA. Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. *Cell Signal* **2013**, 25: 403–416
- Kirsch A. Successful treatment of metastatic malignant melanoma with *Viscum album* extract (Iscador® M). *J. Altern.Complement. Med.* **2007** 13(4): 443–445
- Kleeberg UR, Suci S, Brocker EB, Ruiter DJ, Chartier C, Lienard D, Marsden J, Schadendorf D. Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial:rIFN- α 2b versus rIFN-g versus ISCADOR M1 versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis European. *J. Cancer* **2004**, 40: 390–402
- Korde (Choudhari) S, Sridharan G, Gadail A, Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: A review. *Oral Oncol.* **2012**, 48: 475–483

- Kourmanova GA, Soudarkina JO, Olsnes S, Kozlov VJ, Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L). *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271: 2350–2360
- Kouzi SA, Dowd PF, McChesney JD. Antiinsectan activity of the diterpene sclareol and analogs against fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Nat Prod Lett.* **2013**, 8: 217-223
- Kovacs E. Effects of *Viscum album* extract therapy in patients with cancer: Relation with interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130. *J Altern Complement Med.* **2004**, 10(2): 241–246
- Kovacs E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in sheveral human multiple myeloma cell lines. Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an *in vitro* model. *Sci World J.* **2010**, 10: 311–320
- Kozi I, Yichun Z, Yi L, Jacqueline Z, Hirishi M. Epidermal growth factor induces bladder cancer cell proliferation through activation of the androgen receptor. *Inter. J. Onc.* **2012**, 41: 1587-1592
- Kucharska M, Grabka J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta* **2010**, 80: 1045-1051
- Kuijt J, editor. The biology of parasitic flowering plants. *University of California Press, Berkeley, CA.* **1969**
- Kumrit I, Suksamrarn A, Meepawpan P, Songsri S, Nuntawong N. Labdane-type diterpenes from *Hedychium gardnerianum* with potent cytotoxicity against human small cell lung cancer cells. *Phytother. Res.* **2010**, 24: 1009–1013
- Kuttan G, Menon LG, Kuttan R. Prevention of 20-methylcholanthrene-induced sarcoma by a mistletoe extract, Iscador *Carcinogenesis* **1996**, 17(5): 1107-1109
- Kuzuyama T, Seto H. Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. *Proc. Jpn. Acad.* **2012**, 88 (2)
- Kyrikou I, Georgopoulos A, Hatziantoniou S, Mavromoustakos T, Demetzos C. A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids* **2005**, 133: 125–134
- Labelle M, Richard OH. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* **2012**, 2(12): 1091–1099

- Lampronti I, Saab AM, Gambarti R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol.* **2006**, 29: 989-995
- Lange BM, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnol J.* **2013**, 11: 169–196
- Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. *Viscum album agglutinin-I* (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: Lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res.* **2005**, 29: 1443–1453
- Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. *Viscum album agglutinin-I* induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol.* **2005**, 130: 527–535
- Lavastre V, Binet F, Moisan E, Chiasson S, Girard D. *Viscum album agglutinin-I* induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases. *Br J Haematol.* **2007**, 138: 545–554
- Lavoie JM, Stevanovic T. Variation of Chemical Composition of the Lipophilic Extracts from Lakusić D, Ristić M, Slavkovska V, Lakusić B. Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). *Z Naturforsch C. (Journal of Biosciences)* **2012**, 67(11-12): 571-9
- Lee DY, Lee SJ, Kwak HY, Jung L, Heo J, Hong S, Kim GW, Baek NI. Sterols isolated from Nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 19(11): 1328–1332
- Legnani W. Mistletoe in conventional oncological practice: Exemplary cases. *Integr Cancer Ther.* **2008**, 7(3): 162-171
- Lehman AT, Reddel R, Pfeifer MA, Spillare AE, Kaighn ME, Weston A, Gerwin B, Harris CC. Oncogenes and tumor-suppressor genes. *Environ. Health Persp.* **1991**, 93:133-144
- Li WX, Cui CB, Cai B, Yao XS. Labdane-type diterpenes as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from *Vitex trifolia* L. *J Asian Nat Prod Res.* **2005**, 7(2): 95-105

- Mabed M, El- Helw L, Shamaa S. Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **2004**, 90: 65 – 69
- Macleod K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* **2000**, 10: 81–93
- Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellaridis N, Alevizopoulos K, Demetzos C, Han Z, Pantazis P, Dimas K. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol.* **2011**, 666: 173–182
- Mahmoud RH, Haemel KA, Gary SW. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms, *J Pathol.* **2003**, 199: 275-288
- Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *AntiCancer Drugs* **2002**, 13: 373–379
- Mansky JP, Jean G, Wallerstedt DB, Monahan BP, Blackman MR. Mistletoe and gemcitabine in patients with advanced cancer: A model for the phase I study of botanicals and botanical-drug interactions in cancer therapy. *Intergr Cancer Ther.* **2003**, 2(4): 345-352
- Marino D, Yvonne A, Sarah K, Sabrina R, Nadja BT, Vivianne IO, Mark P, Michael D. Activation of the epidermal growth factor receptor promotes lymphangiogenesis in the skin. *J. Dermat. Science* **2013**, 1-11
- Matthes H, Friedel WE, Bock PR, Zänker KS. Molecular mistletoe therapy: Friend or foe in established anti-tumor protocols? A multicenter, controlled, retrospective pharmaco-epidemiological study in pancreas. *Cancer Curr. Mol. Med.* **2010**, 10: 430-439
- McMurry J, editor. Οργανική Χημεία, I: 559-567
- Mediani A, Abas F, Ping TC, Khatib A, Lajis NH Influence of growth stage and season on the antioxidant constituents of *Cosmos caudatus* *Adv Food Nutr Res.* **2012**, 67: 75-139
- Meister M, Tomasovic A, Banning A, Tikkanen R. Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14: 4854-4884
- Mertens-Walker I, Robert CB, Deborah JM. Gonadotropin signalling in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* **2012**, 324: 152–159

- Meyer A, Rypniewski W, Celewicz L., Erdmann VA, Voelter W, Singh TP, Genov N, Barciszewski J, Betzel Ch. The mistletoe lectin I—Phloretamide structure reveals a new function of plant lectins. *Biochem Biophys Res Commun.* **2007**, 364: 195–200
- Meyer A, Rypniewski W, Szymapski M, Voelter W, Barciszewski J, Betzel C. Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1784: 1590–1595
- Mikeska R, Wacker R, Arni R, Tej PS, Mikhailov A, Gabdoulkhakov A, Wolfgang V, Betzel C. Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties. *Acta Cryst.* **2005**, 61: 17-25
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol.* **2012**, 1-16
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 16:65(1-2): 55-63
- Mulyaningsih S, Youns M, El-Readi MZ, Ashour ML et al. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components *J Pharm Pharmacol.* **2010**, 62: 1037–1044
- Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotech.* **2008**, 7(12): 1797-1806
- Noori S, Hassan ZM, Mohammadi M, Habibi Z, Sohrabi N, Bayanolhagh S. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. *Cell Immunol.* **2010**, 263: 148–153
- Oliveira AP, Pereira JA, Andrade PB, Valentao P, Seabra RM, Silva BM, Phenolic Profile of *Cydonia oblonga* Miller Leaves *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55: 7926–7930
- Olsnes S, Stirpe F, Sandvig K, Pihl A. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). *J Biol Chem.* **1982**, 257(22): 13263-13270
- Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of the MDA and 8-oxo-DG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 30(11): 1286–1292

- Ömer E, Hatice K, Nurettin Y, Zihni D. Antimicrobial activity of *Viscum album* L. subsp. abietis (Wiesb). *Turk J Biol.* **2003**, 27: 255-258
- Onay-Ucar E, Karagoz A, Arda N. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* **2006**, 77: 556-560
- Ostermann T, Raak C, Büssing A, Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer* **2009**, 9: 451
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* **2012**, 45: 487–498
- Paradissis A, Hatziantoniou S, Georgopoulos A, Psarra AMG, Dimas K, Demetzos C. Liposomes modify the subcellular distribution of sclareol uptake by HCT-116 cancer cell lines. *Biomed Pharmacother.* **2007**, 61: 120-124
- Pedro J, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* **2012**, 122(10): 3416-3423
- Pevzner BI, Agapov II, Niwa H, Maluchenko VN, Moisenovich MM, Pfuller U, Tonevitsky GA. Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1675: 155– 164
- Pieme CA, Penlap VN, Ngogang J, Costache M. In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. *Environ Toxicol Pharmacol.* **2010**, 29: 223–228
- Plate HK, Scholz A, Dumont JD. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol.* **2012**, 124: 763–775
- Poornima B. Comparative phytochemical analysis of *Shorea robusta* Gaertn (oleoresin) WSR to its seasonal collection *Anc Sci Life* **2009**, 2(1): 26-28
- Posadzki P, Watson L, Ernst E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews *Br J Clin Pharmacol.* **2012**
- Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther.* **2005** 4(4): 315-321
- Pryme If, Bardocz S, Pusztai A, Ewen SWB. REVIEW: Suppression of growth of tumour cell lines *in vitro* and tumours *in vivo* by mistletoe lectins. *Histol Histopathol.* **2006**, 21: 285-299

- Radenkovic M, Ivetic V, Popovic M, Mimica-Dukic N, Veljkovic S. Neurophysiological effects of mistletoe (*Viscum album* L.) on isolated rat intestines. *Phytother Res.* **2006**, 20: 374–377
- Rakoff-Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? *J. Biol. Med.* **2006**, 79: 123-130
- Ramaekers CSF, Harmsma M, Tussenius JK, Schutte B, Werner M, Ramos M. Mistletoe extracts (*Viscum album* L.) Iscador interact with the cell cycle machinery and target survival mechanisms in cancer cells. *Medicina (Buenos Aires)* **2007**, 67 (2): 79-84
- Ramirez CC, Daniel GF, Robert SK. Skin cancer as an occupational disease: the effect of ultraviolet and other forms of radiation. *Inter. J. Dermat.* **2005**, 44: 95 –100
- Raynaud CM, Laure S, Ophelie P, Ken AO, Jean-Charles S. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Oncol Hematol.* **2008**, 66: 99–117
- Reid N. Coevolution of mistletoes and frugivorous birds. *Aust. J. Ecol.* **1991**, 16: 457-469
- Ribatti D, Crivellato E. Sprouting angiogenesis. *Developm. Biol.* **2012**, 372: 157–165
- Rigling A, Eilmann B, Koechli R, Dobbertin M. Mistletoe-induced crown degradation in Scots pine in a xeric environment. *Tree Physiol.* **2010**, 30: 845–852
- Rodriguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel. *Pharmacogenomics* **2010**, 11(5): 621–623
- Romagnoli S, Fogolari F, Catalano M, Zetta L, Schaller G, Urech K, Giannattasio M, Ragona L, Molinari H. NMR solution structure of viscotoxin C1 from *Viscum album* species *Coloratum ohwi*: Toward a structure-function analysis of viscotoxins. *Biochemistry* **2003**, 42: 12503-12510
- Rongsong L, Carlos MR, Jianhong W. Spatiotemporal variation of mistletoes: a dynamic modeling approach. *Bull Math Biol.* **2011**, 73:1794–1811
- Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfine S. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Cheml Toxicol.* **2013**, 55: 42–47
- Sabová L, Pilátová M, Szilagyi K, Sabo R, Mojžiš J. Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytother. Res.* **2009**, 1-4

- Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer, Part 1. *Cur Oncol.* **2005**, 13(1): 14-26
- Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer, Part 2. *Cur Oncol.* **2005**, 13(3):99-107
- Saleem M., Maddodi N, Zaid MA, Khan N, Hafeez B, Asim M, Suh Y et al. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells *in vitro* and *in vivo* by inducing apoptosis. *Clin Cancer Res.* **2008**, 14(7): 2119-2127
- Salle G, Origin and early growth of the sinkers of *Viscum album* L. *Protoplasma* **1978**, 96: 267-273
- Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Cancer Epid. Prevent.* **2013**, 3(114): 1-8
- Santarpia L, Lippman S, El-Naggar A. Targeting the mitogen-activated protein kinase RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* **2012**, 16(1): 103–119
- Sashidhara KV, Rosaiah JN, Kumar A et al. Cell growth inhibitory action of an unusual labdane diterpene, 13-*epi*-sclareol in breast and uterine cancers *in vitro*. *Phytother. Res.* **2007**, 21:1105–1108
- Scanlon SC, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J. Dent. Res.* **2013**, 92(2): 114-122
- Schalk M, Pastore L, Mirata MA, Khim S, Schouwey M, Deguerri F, Pineda V, Rocci L, Daviet L. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134: 18900–18903
- Schiffman DJ, James IG, Erin M, Anthony M, Lindsey M. Update on Pediatric Cancer Predisposition Syndromes. *Pediatr Blood Cancer* **2013**, 1-6
- Scully JO, Boon-Huat B, Yip G, Yingnan Y. Breast cancer metastasis. *Cancer Genom. Proteom.* **2012**, 9: 311-320
- Schrader-Fischer C, Apel K. The anticyclic timing of leaf senescence in the parasitic plant *Viscum album* is closely correlated with the selective degradation of sulfur-rich viscotoxins. *Plant Physiol.* **1993**, 101: 745-749

- Seifert G, Jesse P, Laengler A, Reindl T, Luth M, Lobitz S, Henze G, Prokop A, Holger NL. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett.* **2008**, 264: 218-228
- Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol.* **2006**, 16: 53–65
- Sekeroglu ZA, Sekeroglu V. Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutat Res.* **2012**, 746: 56– 59
- Shyu MH, Kao TC, Yen GC. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58: 6110–6118
- Sidler F, Wermelinger T, Rist L, Hensel A, Viviani A. Influence of mistletoe extracts and its components on in vitro physiology of cancer cells *Animal Cell Technology meets Genomics* **2005**, 183-185
- Skipski VP, Barclay M, editors. Methods in enzymology. **1969**, 54: 556-562
- Skorica M, Todorovica S, Gligorijevic N, Jankovic R, Zivkovic S et al. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus subsp. creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind Crops Prod.* **2012**, 38: 153– 159
- Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants *Chem Biodivers.* **2012**, 9(2): 409-17
- Smith PL, Gledhill D. Anatomy of the endophyte of *Viscum album* L. (Loranthaceae). *Bot J Linn Soc.* **1983**, 87: 29-53
- Snogerup S, Snogerup B, editors. Flora Hellenica, *Viscum* L. 1: 67-68
- Sood A, Barton DL, Bauer BA, Loprinzi CL. A Critical Review of Complementary Therapies for Cancer-Related Fatigue. *Integr Cancer Ther.* **2007**, 6(1): 8-13
- Speranza A. Into the world of steroids, a biochemical “keep in touch” in plants and animals. *Plant Signal Behav.* **2010**, 5(8): 940-943
- Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Action of Viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J Biol Chem.* **1982**, 257(22): 13271-13277.
- Strüh CM, Jäger S, Schempp CM, Scheffler A, Martin SF. A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells. *Phytother. Res.* **2012**, 1-6

- Styczynski J, Wysocki M. Alternative medicine remedies might stimulate viability of leukemic cells. *Pediatr Blood Cancer* **2006**, 46: 94–98
- Sun L, Simmerling C, Ojima I. Recent Advances in the Study of the Bioactive Conformation of Taxol. *Chem Med Chem.* **2009**, 4(5): 719–731
- Tabiasco J., Pont F., Fournie J.J, Vercellone A., Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269: 591–2600
- Teh SS, Lian Ee GC, Mah SH, Lim YMi 2, Rahmani M. Mesua beccariana (Clusiaceae), A source of potential anti-cancer lead compounds in drug discovery. *Molecules* **2012**, 17: 10791-10800;
- Tenorio FA, Valle L, Gonzalez A, Pasteln G. Vasodilator activity of the aqueous extract of Viscum album. *Fitoterapia* **2005**, 76: 204–209
- Thao NTP, Hung TM, Lee mk et al. Triterpenoids from Camellia japonica and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58(1): 121-124
- Thoday D, The haustorial system of *Viscum album*. *J Ex. Bot.* **1951**, 11(1):1-19
- Tomek M, Toru A, Crispin RD. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy. *J Pharm Pharmacol.* **2012**, 64: 1695–1702
- Torres FA, Fadeel B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. *Acc Chem Res.* **2013**, 46(3): 733-742
- Trapp SC, Croteau RB. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **2001**, 158: 811–832
- Tsikakos D, Suchy MT, Niemann J, Tossios P, Schneider Y et al. Glutathione promotes prostaglandin H synthase (cyclooxygenase)-dependent formation of malondialdehyde and 15(S)-8-iso-prostaglandin F2a. *FEBS Letters* **2012**, 586: 3723–3730
- Tusenius K J, Spoek JM, Kramers CW. Iscador Qu for chronic hepatitis C: an exploratory study. *Complement Ther Med.* **2001**, 9:12–16
- Urech K, Scher JM, Hostanska K, Becker H. Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from Viscum album L. *J Pharm Pharmacol.* **2005**, 57(1): 101-9.
- Urech K, Schaller G, Jäggy C. Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador *Nat Prod Commun.* **2013**, 8(1):131-4
- Van Huyen Duong JP, Bayry J, Delignat S, Gaston TA, Odile M, Bruneval P, Kazatchkine DM, Nicoletti A, Kaveri VS. Induction of apoptosis of endothelial

- cells by *Viscum album*: A role for anti-tumoral Properties of mistletoe lectins. *Mol Med.* **2002**, 8(10): 600–606
- Van Huyen Duong JP, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD., Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett.* **2006**, 243: 32–37
- Veenstra M, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR2: physiology regulator and neuroinflammation controller? *J Neuroimmunol.* **2012**, 15: 246(1-2): 1–9
- Vicas SI, Rucina D, Pantea S, Socaciu C. The morphological features and UV-VIS analysis of some taxonomic markers of genus *Viscum*. *Agriculture* **2009**, 66(1): 193-200
- Vicas SI, Laslo V, Pantea S, Bandici GE. Chlorophyll and carotenoids pigments from mistletoe (*Viscum album*) leaves using different solvents. *Fascicula Biologie* **2010**, 17(2):213-218
- Vidal-Russell R, Daniel LN. The first mistletoes: Origins of aerial parasitism in Santalales. *Mol Phylogenetic Evol.* **2008**, 47: 523–537
- Vishwakarma RK, Patel KA, Sonawane P et al. Molecular characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from *Bacopa monniera* by comparative modeling and docking studies. *Bioinformation* **2012**, 8(22): 1075-1081
- Vlad PF. The chemistry of perfumes based on labdane diterpenoids. *Rus Chem Rev.* **1982**, 51 (7): 644-658
- Vlad PF, Aryku AN. Ozonolytic transformations of labdane diterpenoids. *Rus Chem Rev.* **1992**, 61(7): 716-730
- Vlad PF, Ciocarlan A, Edu C, Aricu A, Biriiac A et al. Regio- and stereoselective synthesis of (+)-6-ketoeuryfuran, (+)-6-ketowinterin, and (-)-7-ketoeuryfuran from accessible labdane diterpenoids (+)-larixol and (-) sclareol. *Tetrahedron* **2013**, 69: 918-926
- Vogelstein B. Kenneth WK, Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* **2004**, 10(8): 789-799
- Voziyan PA, Haug JS, Melnykovych K. Mechanism of farnesol cytotoxicity: Further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **1995**, 212(2): 479-486

- Wacker R, Stoeva S, Pfuller K, Pfuller U, Voelter W. Complete structure determination of the A chain of mistletoe lectin III from *Viscum album* L. ssp. *album*. *J. Peptide Sci.* **2004**, 10: 138–148
- Wacker R, Stoeva S, Betzel C, Voelter W. Complete structure determination of N-acetyl-D galactosamine- binding mistletoe lectin-3 from *Viscum album* L. *album*. *J. Peptide Sci.* **2005**, 11: 289–302
- Wang D, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **2010**, 11; 29(6):781–788
- Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules* **2012**, 17: 2704-2713
- War AR, Paulraj MJ, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav.* **2012**, 7(10): 1306-1320
- Wargovitz MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* **2000**, 21(6): 1149-1155
- Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *JPP* **2011**, 63: 1378–1386
- Wei LS, Wee W, Siong JY, Syamsumir DF. Characterization of anticancer, antimicrobial, antioxidant properties and chemical compositions of *Peperomia pellucida* leaf extract. *Acta Med Iran* **2011**, 49(10): 670-4
- Weis MS, Cheresh AD. Integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2011**, 1: 1-14
- Wenhui Y, Ravi PRN, Cong BK, Song JH, Song SK, Yoon HS. Molecular characterization of the recombinant a-chain of a type II ribosome-inactivating protein (RIP) from *Viscum album coloratum* and structural basis on its ribosome-inactivating activity and the sugar-binding properties of the b-chain. *J Biochem Mol Biol.* **2006**, 39(5): 560-570
- Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* **2010**, 25(2): 85–101
- Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol.* **2012**, 34(3): 255–262

- Woolery TK, Kruk AP. Ovarian epithelial-stromal interactions: Role of interleukins 1 and 6. *Obstet Gynecol Int.* **2011**, 1-9
- Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem. Rev.* **2012**, 112: 5967–6026
- Yance RD, Sagar MS. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther.* **2006**, 5(1): 9-29
- Yesilada E, Deliorman D, Ergun F, Takaishi Y, Ono Y. Effects of the Turkish subspecies of *Viscum album* on macrophage-derived cytokines *J Ethnopharmacol.* **1998**, 61: 195–200
- 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 Radiopharms.* **2001**, 16(1): 55-62
- Zhang XQ, Huang XF, Mu SJ, An QX, Xi AJ, Chen R, Wu DC. Inhibition of proliferation of prostate cancer cell line, PC-3, in vitro and in vivo using (–)-gossypol. *Asian J Androl.* **2010**, 12: 390–399
- Ziegler R, Grossarth-Maticek R. Individual patient data meta-analysis of survival and psychosomatic self-regulation from published prospective controlled cohort studies for long-term therapy of breast cancer patients with a mistletoe preparation (Iscador). *eCAM* **2010**, 7(2): 157–166
- Zuber D, Widmer A. Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol Ecol.* **2000**, 9: 1069–1073
- Zuber D. Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora* **2004**, 199: 181–203
- Zuber D, Widmer A. Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Mol Ecol.* **2009**, 18: 1946–1962
- Zweifel R, Bangerter S, Rigling A, Frank JS. Pine and mistletoes: how to live with a leak in the water flow and storage system? *J. Exp. Botany* **2012**, 1-14