

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Τομέας Βιολογίας Φυτών
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών

Εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων στο
φυτό Ιξός (*Viscum album* L.) για την παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών



Διδακτορική Διατριβή
Μπαρμπεράκη Μαρία
Γεωπόνος-Βιοτεχνολόγος

ΑΘΗΝΑ 2011

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Τομέας Βιολογίας Φυτών
Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών

Εφαρμογή βιοτεχνολογικών μεθόδων στο
φυτό Ιξός (*Viscum album* L.) για την παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών

Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Δρ. Σπυρίδων Κίντζιος

Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δρ. Γεώργιος Αϊβαλάκης

Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δρ. Νικόλαος Λάμπρου

Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Διδακτορική Διατριβή
Μπαρμπεράκη Μαρία
Γεωπόνος-Βιοτεχνολόγος

ΑΘΗΝΑ 2011

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη και την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Σπύρο Κίντζιο για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του, για τις πολύτιμες υποδείξεις του και για την συνεχή βοήθειά του.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αϊβαλάκη Γεώργιο για την έμπρακτη βοήθεια του και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νίκο Λάμπρου για την συμμετοχή του στην Τριμελή μου Επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής Καθηγητή κ. Μαργιωρή Ανδρέα, ιδιαίτερα, καθώς και τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας και κυρίως την κ. Ρένα Δερμιτζάκη, για την έμπρακτη βοήθειά τους στην οργάνωση και ολοκλήρωση των βιοδοκιμών σε καρκινικές σειρές κυττάρων στο Τμήμα Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ηρακλείου Κρήτης, τον Διευθυντή της Μονάδας Μεταμοσχεύσεων Μυελού του Νοσοκομείου Παίδων “Αγία Σοφία” κ. Γραφάκο Στέλιο και την εργαστηριακή του ερευνήτρια κ. Θεοδοσάκη Μαρία, τον Καθηγητή κ. Ρούσση Βασίλειο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κιτσάκη Χριστίνα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

NAA	α-ναφθαλινοξεϊκό οξύ
ROS	ενεργές μορφές οξυγόνου
Kin	κινετίνη
2, 4-D	2,4-διχλωροφαινοξυοξεϊκό οξύ
μg/kg	μιλιγκραμ/κιλό (χιλιόγραμμα ανά κιλό)
NCI	National Cancer Institute (Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου Η.Π.Α.)
CPTs	καπτοθεκίνες
CaCl ₂	χλωριούχο ασβέστιο
HgCl ₂	χλωριούχος υδράργυρος
min	minutes (λεπτά)
mg/l	χιλιογραμμάρια ανά λίτρο
BA	6-βενζυλαδερίνη
AT	άθροισμα τετραγώνων
BE	βαθμοί ελευθερίας
MT	μέσα τετράγωνα
A.O.	ασκορβικό οξύ
γρ	γραμμάρια
MS	θρεπτικό υπόστρωμα τύπου Murashige & Skoog
HMIKYTT	ημικυτταρίνη
ml/l	χιλιόλιτρα ανά λίτρο
ΔΙΗΘ	διήθημα
KYTTAP	κυτταρίνη
CH ₃ COONa	οξικό νάτριο
g/l	γραμμάρια ανά λίτρο
g	γραμμάρια
N.B.	νωπό βάρος
Ξ.Β.	ξηρό βάρος
Alt-4	αλδοτετραουρονικό οξύ
Γ1B	εκχύλισμα από ιξό

E1B	εκχύλισμα από έλατο
εβδ.	εβδομάδες
K	κάλιο
P	φώσφορος
Mg	μαγνήσιο
ppm	μέρη στο εκατομμύριο
M.O.	μέσος όρος
Fe	σίδηρος
Mn	μαγγάνιο
Zn	ψευδάργυρος
Cu	χαλκός
B	βόριο
8P	8 μέρη πεκτινάσης
7C	7 μέρη κυτταρινάσης
μ.ο.β.κ.	μέσος όρος βάρους κάλου
φ.	φύλλο
β/ο	βάρος κατά όγκο
ο/ο	όγκος κατά όγκο
NaOH	καυστικό νάτριο
HCl	υδροχλώριο
IAA	ινδολοοξεικό οξύ
cw	εκχύλισμα καρύδας (coconut water)
h	ώρες
H ₂ SO ₄	θειϊκό οξύ
nm	νανόμετρο
HNO ₃	νιτρικό οξύ
HClO ₄	υπερχλωριώδες οξύ
mA	χιλιοΑμπέρ
kDa	κιλοντάλτον
BFU-E	φυσιολογική κυτταρική σειρά ανθρωπίνων ερυθροκυττάρων
CFU-GM	φυσιολογική κυτταρική σειρά ανθρωπίνων ερυθροκυττάρων
VERO	φυσιολογική κυτταρική σειρά νεφρικών κυττάρων πιθήκου
PC12	καρκινική κυτταρική σειρά από επινεφριδιακά κύτταρα αρουραίου

RAW	καρκινική κυτταρική σειρά από μακροφάγα κύτταρα ποντικού
CO ₂	διοξείδιο του άνθρακα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΟΥ VISCUM ALBUM L.	16
1.1.1. Βοτανική Ταξινόμηση – Περιγραφή	16
1.1.2. Οικονομική Σημασία – Χρήσεις	17
1.1.3. Είδη – Ξενιστές	19
1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ	20
1.3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ	21
1.4. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ VISCUM ALBUM L.	27
1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	38
1.5.1. Επίπτωση και αιτίες	38
1.5.2. Ταξινόμηση των τύπων καρκίνου	40
1.6. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	42
1.6.1. Συμβατικές Μέθοδοι αντιμετώπισης του καρκίνου	42
1.6.2. Προηγμένες αντικαρκινικές θεραπείες	44
1.6.3. Άλλες προηγμένες θεραπείες	47
1.6.4. Εναλλακτικές αντικαρκινικές θεραπείες	47
1.6.5. Από την πηγή στον ασθενή: Δοκιμάζοντας τη δραστικότητα ενός υποψήφιου αντικαρκινικού φαρμάκου	47
1.6.5.1. Προκλινικές δοκιμασίες	48
1.6.6. Φάσεις των κλινικών δοκιμών	49
1.6.6.1. Πρωτόκολλα κλινικών δοκιμασιών	50
1.7. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	52
1.7.1. Η βιοτεχνολογία φυτών στη φαρμακευτική έρευνα	52
1.7.2. Βιοτεχνολογία και πρώτη ύλη ή φυσικά προϊόντα	53
1.7.3. Η Βιοτεχνολογία του <i>Viscum album L.</i>	54
1.8. ΑΛΛΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	56
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
2.1. Σκοπός της μελέτης	60
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	62
3.1. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	62
3.1.1. Φυτικό υλικό – Έκφυτο	62
3.1.2. Ασηπτικό Περιβάλλον	63
3.1.2.1. Αποστείρωση	63
3.1.2.2. Απολύμανση εκφύτων (φύλλων και βλαστών)	63
3.1.2.3. Προμεταχείριση άλλων εκφύτων (ανθέρων και καρπών)	65
3.1.3. Συνθήκες ανάπτυξης	65
3.1.4. Εμφυτεύσεις – Είδος Εκφύτου	65
3.1.5. Εμφυτεύσεις-Περίοδος ανάπτυξης φυτού	67
3.1.6. Υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων	69
3.1.7. Μελέτη της επίδρασης της φωτοπεριόδου	71

3.1.8. Επεξεργασία αποτελεσμάτων ιστοκαλλιεργητικών πειραμάτων	72
3.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	72
3.2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	72
3.2.1.1. Ανάλυση Μακροστοιχείων και Μικροστοιχείων	72
3.2.1.1.1. Συσσώρευση επιλεγμένων μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού: επίδραση της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου	72
3.2.1.1.2. Επεξεργασία αποτελεσμάτων ανάλυσης ανόργανων στοιχείων	74
3.2.1.1.3. Ολικά Φαινολικά	74
3.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΙΞΟΥ	74
3.2.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	75
3.2.3.1. Εκχύλιση πρωτεΐνης ιξού	75
3.2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών	75
3.2.3.3. Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα	75
3.2.4.1. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ	76
3.2.5.1. Βιοδοκιμές Τοξικότητας σε φυσιολογικές και καρκινικές σειρές	76
3.2.5.2. Βιοδοκιμές ελευθέρων ριζών (ROS)	78
3.2.5.3. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων	78
3.2.5.4. Απομόνωση Μιτοχονδρίων	79
3.2.5.4.1. Βιοδοκιμές κυτοχρωμικής οξειδάσης C	79
3.2.5.4.2. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων	79
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
4.1. ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΙΞΟΥ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥΣ	80
4.1.1. Ανταπόκριση των εκφύτων στην απολύμανση	80
4.1.2. Επίδραση της προέλευσης του εκφύτου και της περιόδου ανάπτυξης του φυτού στην καλογένεση	80
4.2 ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	85
4.2.1 Υποστρώματα με αυξίνες	85
4.2.2. Υποστρώματα με κυτοκινίνες	86
4.2.3. Συνδυασμοί Υποστρωμάτων	88
4.2.4. Υποστρώματα με Ασκορβικό οξύ	91
4.2.5. Υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων	94
4.2.6. Ανταπόκριση των εκφύτων στην επίδραση της φωτοπερίόδου	99
4.2.7. Σωματική Εμβρυογένεση	101
4.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	103
4.3.1. Συσσώρευση επιλεγμένων μακροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού: επίδραση της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου	103
4.3.1.1. Επίδραση των ρυθμιστών ανάπτυξης στην in vitro συσσώρευση μακροστοιχείων	103
4.3.1.2. Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην in vitro συσσώρευση μακροστοιχείων	108
4.3.1.3. Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας στην in vitro συσσώρευση μακροστοιχείων	111
4.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	112
4.4.1. Επίδραση της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου στο σχήμα κατανομής επιλεγμένων μικροδιατροφικών	

παραγόντων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού	109
4.4.1.1. Επίδραση της προσθήκης ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης στη συγκέντρωση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro	112
4.4.1.2. Επίδραση του ασκορβικού οξέος στη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro	116
4.4.1.3. Επίδραση της διάρκειας καλλιέργειας στη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro	120
4.5. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ	121
4.6. ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ	122
4.6.1. Απομόνωση Πρωτοπλαστών	122
4.7. ΠΑΡΑΓΩΓΗ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	124
4.7.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών	124
4.7.1.1. Ποσοτικός Προσδιορισμός	124
4.7.1.2. Ποιοτικός Προσδιορισμός	127
4.7.2. Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα	128
4.7.3. Μακροσκοπική παρατήρηση	130
4.8. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ	133
4.8.1. Βιοδοκιμές τοξικότητας	133
4.8.1.1. Βιοδοκιμές τοξικότητας σε φυσιολογικές σειρές	133
4.8.1.2. Βιοδοκιμές τοξικότητας σε καρκινικές σειρές	136
4.8.2. Βιοδοκιμές ελευθέρων ριζών	142
4.8.3. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων	144
4.8.4. Απομόνωση μιτοχονδρίων	146
4.8.4.1. Βιοδοκιμές κυτοχρωμικής οξειδάσης C	147
4.8.4.2. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων	149
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	152
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	163
7. ΠΙΝΑΚΕΣ	175
8. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ	203
9. ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ	210

Περίληψη

Η αποδεδειγμένη δράση και χρήση του ιξού για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων στην ιατρική (έγκριση από το FDA- Η.Π.Α, έγκριση κυκλοφορίας σε χώρες της Ευρώπης) όπως νευρολογικές, καρδιακές και σήμερα περισσότερο για διάφορες μορφές καρκίνου, το κατέστησαν αντικείμενο ενδιαφέροντος από πολλούς μελετητές. Θεωρείται ότι διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και επηρεάζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων και της κυτταρικής απόπτωσης. Χρησιμοποιείται και στην πρόληψη του καρκίνου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας, θηλωμάτωση της ουροδόχου κύστης και πολύποδα παχέος εντέρου.

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στην σωματική εμβρυογένεση και άλλες πλεονεκτικές πλευρές της ιστοκαλλιέργειας που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην χρήση του ιξού ως φαρμακευτικό φυτό, μέσω της εφαρμογής βιοτεχνολογικών μεθόδων, εφόσον η έως, πριν την παρούσα μελέτη, επιβεβαιωμένη έρευνα με ιστοκαλλιέργεια στο *Viscum album* ήταν περιορισμένη σ' ένα πολύ μικρό αριθμό μελετών.

Λόγω της ημι-παρασιτικής φύσης του συγκεκριμένου είδους, είναι πολύ δύσκολο ν' αναπαραχθεί. Η βιοτεχνολογία μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική μέθοδο παραγωγής αξιόλογης ποσότητας βιομάζας του ιξού σ' ένα σχετικά σύντομο χρόνο, είτε μέσω κυττάρων ή αναπαραγόμενων κάλων, ή σωματικής εμβρυογένεσης.

Προκειμένου να καθοριστούν οι άριστες συνθήκες για την ιστοκαλλιέργεια του ιξού (*Viscum album*), μελετήθηκαν τα αποτελέσματα σε διάφορα φυτικά μέρη (άνθη, βλαστοί, φύλλα, καρποί), εποχή συγκομιδής, (χειμώνας, καλοκαίρι), μέθοδοι απολύμανσης του εκφύτου, ρυθμιστές αύξησης και καλλιεργητικά μέσα. Μόνο έκφυτα προερχόμενα από φυτά το χειμώνα ανταποκρίθηκαν στις καλλιεργητικές συνθήκες και η μεγαλύτερη συγκέντρωση φρέσκου κάλου παρατηρήθηκε στον συνδυασμό 4.95 μM NAA + 2.82 μM BA. Περισσότεροι κάλοι παρήχθησαν από έκφυτα βλαστού, αλλά τα καλλιεργούμενα έκφυτα φύλλων έδωσαν γρηγορότερα κάλους. Η προσθήκη 10 mg L^{-1} ασκορβικού οξέος βελτίωσε την παραγωγή κάλων και την ανάπτυξή τους. Ηλεκτροφορετική ανάλυση των παραγόμενων πρωτεϊνών από έκφυτα βλαστού φανέρωσαν ένα σχεδόν ίδιο πρότυπο με το φυτό δότη.

Στην προσπάθεια να εκτιμηθεί η επίδραση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας στην παραγωγή πρωτεϊνών από τον ιξό (*Viscum album* L.) 1.000 ξεχωριστοί κάλοι εξετάστηκαν για το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Η παρατηρηθείσα σωμακλωνική παραλλακτικότητα ήταν (και από ποσοτικής πλευράς κι από ποιοτικής) σχετικά χαμηλή: στο 8%, αποδεικνύοντας όμως για πρώτη φορά την πιθανότητα παραγωγής *in vitro* σταθερών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με κυτοτοξικές και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, όπου μελλοντικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην σημαντική παραγωγή νέων προϊόντων με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες.

Ξεκινήσαμε καλλιέργειες κάλων ιξού (*Viscum album* L.) εμφυτεύοντας έκφυτα φύλλων και βλαστών σε καλλιεργητικό μέσο Murashige & Skoog εμπλουτισμένο με διάφορους συνδυασμούς ρυθμιστών ανάπτυξης σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Οι καλλιέργειες εξετάστηκαν για συσσώρευση K, P, Ca και Mg. Τόσο η αγωγή με ρυθμιστή ανάπτυξης και η προέλευση του εκφύτου, όσο και η αλληλεπίδρασή τους επηρέασαν σημαντικά τη συσσώρευση όλων των

μακροστοιχείων. Όσον αφορά τους προερχόμενους από βλαστούς κάλους, η εφαρμογή 4.65 μM Kin ήταν ανώτερη άλλων PGR αγωγών επιφέροντας τη μέγιστη *in vitro* συσσώρευση των επιλεγμένων μακροστοιχείων. Επιπροσθέτως, η μέση *in vitro* συσσώρευση ήταν υψηλότερη στις καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από βλαστούς σε σύγκριση με τους προερχόμενους από φύλλα κάλους. Η *in vitro* συσσώρευση καλίου, P και Ca ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τα φυτά ιξού και χαμηλότερη σε σύγκριση με τους ξενιστές ιξού, όπως έλατο, βελανιδιά και καστανιά. Τα φυτά ιξού μπόρεσαν να συσσωρεύσουν K σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τους ξενιστές. Με εξαίρεση το Ca, η συσσώρευση μακροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από βλαστούς συσχετιζόταν ισχυρά με τη συγκέντρωση επί ξηρού βάρους. Επίσης, παρατηρήθηκε υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων K, P και Mg, ενώ η συσσώρευση Ca ήταν σχετικά υψηλή και συσχετιζόμενη θετικά με το Mg. Αντιθέτως, σε καλλιέργειες προερχόμενες από φύλλα παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ των συγκεντρώσεων K και Mg.

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο επηρέασε σημαντικά τη συσσώρευση P και Ca σε κάλους προερχόμενους από βλαστούς και τη συγκέντρωση K και Mg σε κάλους προερχόμενους από φύλλα. Εντούτοις, η συγκέντρωση Ca σε κάλους προερχόμενους από φύλλα και η συγκέντρωση Mg σε κάλους προερχόμενους από βλαστούς ελαττώθηκαν μετά την προσθήκη ασκορβικού οξέος.

Τέλος, η συγκέντρωση των επιλεγμένων μακροστοιχείων παρουσίασε διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια συνολικής επώασης δέκα εβδομάδων σε καλλιεργητικό μέσο MS + 4.95 μM NAA, με τάση ανόδου μετά την όγδοη εβδομάδα. Τα αποτελέσματα συζητούνται υπό το πρίσμα των πιθανών μεταβολικών οδών οι οποίες απαιτούν τα υπό μελέτη μακροστοιχεία, καθώς και της βελτίωσης της *in vitro* καλλιέργειας ιξού.

Προκειμένου να μελετηθεί το σχήμα συσσώρευσης επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων *in vitro* σε καλλιέργειες κάλου από ιξό (*Viscum album* L.), εμφυτεύσαμε έκφυτα από φύλλα και βλαστούς ιξού σε θρεπτικό μέσο Murashige και Skoog (MS) εμπλουτισμένο με διάφορους συνδυασμούς ρυθμιστών φυτικής ανάπτυξης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η συσσώρευση του μαγγανίου (Mn), του ψευδαργύρου (Zn), του χαλκού (Cu) και του βορίου (B) στις καλλιέργειες κάλου ιξού επηρεαζόταν σημαντικά τόσο από την παρουσία ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης (PGR) όσο και από την προέλευση του εκφύτου, καθώς και από την αλληλεπίδρασή τους. Ωστόσο, κανείς από αυτούς τους παράγοντες δεν επηρέασε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τη συγκέντρωση σιδήρου (Fe). Η μέση συγκέντρωση Fe, Mn, Zn και Cu *in vitro* ήταν μεγαλύτερη σε καλλιέργειες κάλου από βλαστούς σε σχέση με καλλιέργειες κάλου από φύλλα και πολύ υψηλότερη σε σχέση με φυτά ιξού και ξενιστών αυτού, όπως η ελάτη, η δρυς και η καστανιά. Στις καλλιέργειες κάλου από βλαστούς, με την εξαίρεση του B, προσθήκη 4.65 mM κινετίνης (Kin) ήταν ανώτερη όλων των άλλων προσθηκών PGR οδηγώντας στη μέγιστη *in vitro* συσσώρευση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων. Με την εξαίρεση του B, η συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες κάλου από βλαστούς συσχετιζόταν σημαντικά με τη συγκέντρωση ξηρού βάρους. Υψηλή θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των συγκεντρώσεων Fe, Mn, Zn και Cu, ενώ η συσσώρευση του B συσχετιζόταν ελαφρώς αρνητικά με τους άλλους μικροδιατροφικούς παράγοντες. Αντιθέτως, σε καλλιέργειες κάλου από φύλλα, υψηλή θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ των συγκεντρώσεων Mn και Cu. Η συγκέντρωση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων κυμαινόταν κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης συνολικά 10 εβδομάδων σε μέσο MS 4.95

mM α-ναφθυλοξικό οξύ (NAA), με αυξητική τάση μετά την όγδοη εβδομάδα (με τη συγκέντρωση B να αποτελεί και πάλι την εξαίρεση). Τέλος, η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο προήγαγε γενικώς τη συσσώρευση των μικροδιατροφικών παραγόντων, ιδιαίτερα του Mn και του Cu σε καλλιέργειες κάλου από βλαστούς και των Fe, Zn και B σε καλλιέργειες κάλου από φύλλα. Η επίδραση αυτή συσχετιζόταν με αύξηση των συνολικών ελεύθερων φαινολικών ενώσεων και συζητείται περαιτέρω σε σχέση με τα διάφορα φυτικά αντιοξειδωτικά συστήματα *in vitro*.

Στην προσπάθεια να οριστούν οι άριστες συνθήκες για την απομόνωση πρωτοπλαστών από τον ιξό (*Viscum album*), μελετήθηκαν οι επιδράσεις των χειρισμών αφαίρεσης του κυτταρικού τοιχώματος από τεμάχια φύλλων και κάλους προερχόμενους από φύλλα ιξού. Ο μέγιστος αριθμός βιώσιμων πρωτοπλαστών που απομονώθηκε προήλθε από φύλλα ιξού στο διάλυμα με 0.016% πεκτινάση και 0.007% σελλουλάση και έφτανε τους 67×10^4 g fw⁻¹.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση δειγμάτων που προέρχονταν από βλαστούς ιξού (200) και κάλους ιξού (1000) από ιστοκαλλιέργεια βλαστών ιξού σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+ 10 mg L⁻¹ ασκορβικού οξέος + 4.95 μM NAA + 2.82 μM BA, προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαλυτές πρωτεΐνες του ιξού.

Η ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με την μέθοδο Bearden (Bearden, 1978) κι η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σύμφωνα με τον Laemmli (1979) χρησιμοποιώντας 10% gel πολυακρυλαμίδης δύο φάσεων (συσσώρευσης και διαχωρισμού), ενώ για τον προσδιορισμό των ουσιών ηλεκτροφόρησης (πιστοποίηση πρωτεϊνών), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος νιτρογλυκερίνης (Warkner, 1994).

Διαπιστώθηκε ότι ο μέσος όρος πρωτεΐνης που περιέχεται ανά κάλο είναι 1.178 ± 0.058 μg/g f.w. (νωπό βάρος), ενώ στο αρχικό φυτό δότη είναι 1.318 ± 0.18 μg/g f.w. (νωπό βάρος).

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έδειξε πέντε βασικές μπάντες σε όλα τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν (500 διαφορετικά δείγματα) οι οποίες ήταν οι εξής: 53, 76, 116 και 170 kDa, αντιπροσωπεύοντας διμερή και μονομερή μορφές των λεκτινών (στα 114 και 57 kDa) (Olsnes, 1982; Vester, 1977). Αυτές οι πρωτεϊνικές μπάντες εντοπίζονται και στο αρχικό φυτό (φυτό δότης), μαζί με μια ακόμη μπάντα πρωτεΐνης στα 212 kDa.

Ακόμη, σε σαράντα σειρές κάλων εμφανίστηκαν πέντε επιπλέον πρωτεϊνικές μπάντες, από αυτές που παρουσίαζε το φυτό-δότης από τις οποίες τρεις ήταν < 53 kDa, μία περίπου στα 100 kDa και μία περίπου 150 kDa. Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι επίσης στενός κρίκος στην κυτταρική διαφοροποίηση. Το γεγονός αυτό δίνει την δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών του ιξού σε υψηλό ρυθμό από τους εμβρυογενείς κάλους του ιξού, που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη και έδειξαν υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης. Η παρούσα εμφανιζόμενη σωμακλωνική παραλλακτικότητα, από πλευράς ποιοτικής και ποσοτικής παραγωγής πρωτεϊνών του ιξού, κυμαίνεται στο 8%, και δείχνει για πρώτη φορά την πιθανότητα της *in vitro* παραγωγής σταθερών και καθορισμένων εκχυλισμάτων πρωτεϊνών με κυτοτοξικές και άνοσο-ρυθμιστικές ιδιότητες.

Για να διαπιστωθεί και συγκριθεί η δράση των πρωτεϊνών, προερχόμενων από κάλους και σωμακλωνικούς κάλους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιοδοκιμών.

Αρχικά, δοκιμάστηκαν ως προς την τοξικότητά τους σε τρεις σειρές φυσιολογικών κυττάρων, και δύο καρκινικών κυττάρων και για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, όπου διαπιστώθηκε ότι για τα φυσιολογικές σειρές σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικά, ενώ ο σωμακλωνικός κάλος δεν είναι τοξικός στις

χαμηλές συγκεντρώσεις και για τις καρκινικές σειρές ότι είναι τοξικά σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές σε φυσιολογικές σειρές VERO και καρκινικές σειρές PC12, μέτρησης ελεύθερων ριζών, μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων, και απομόνωσης μιτοχονδρίων (μετρήσεις κυτοχρωμικής οξειδάσης C, και μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων).

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης περιγράφουν την πρώτη ολοκληρωμένη προσέγγιση τόσο της ιστοκαλλιέργειας του *Viscum album* όσο και της δυνατότητας δημιουργίας κυτταρικών εργοστασίων για την παραγωγή λεκτινών και άλλων ουσιών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Ειδικότερα, η διαπίστωση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας και της συνεπακόλουθης παραγωγής πρωτεϊνών με αυξημένη επιλεκτική κυτταροτοξικότητα προσφέρουν ένα ελκυστικό πεδίο μελέτης. Ανάμεσα στα προτεινόμενα αντικείμενα έρευνας ανήκει η διαλεύκανση του βιοχημικού μονοπατιού βιοσύνθεσης της παραλλαγμένης πρωτεΐνης, με προοπτικές απομόνωσης του σχετικού γενετικού μηχανισμού. Επίσης θα πρέπει να συσχετισθούν τα αποτελέσματα των δοκιμών *in vitro* με αντίστοιχα *in vivo* (σε πειραματόζωα).

Abstract

In an attempt to define the optimal conditions for mistletoe (*Viscum album*) callus culture, somatic embryogenesis and protoplast isolation, we studied the effects of different plant parts (stems and leaves), harvest time (winter or summer), explant disinfection methods, growth regulators, culture medium composition and cell wall digestion treatments. Only explants derived from the winter mistletoe accessions responded to the applied culture conditions and maximum callus fresh weight was obtained on a combination of 4.95 μM NAA + 2.82 μM BA. More calli were induced from stem explants, but leaf-derived calli grew faster. The addition of 10 mg l⁻¹ ascorbic acid considerably improved callus induction and growth and was associated with the formation of embryogenic, pink-whitish callus tissues. A maximum number of 67 x 10⁴ viable protoplasts g fw⁻¹ tissue were obtained by digesting mistletoe leaves in a solution containing 0.016% pectinase and 0.007% cellulase. Finally, an electrophoretic analysis of proteins produced by stem-derived callus tissues revealed an almost identical pattern to the donor plant.

In an attempt to preliminary evaluate the effect of somaclonal variation on the production of white berry mistletoe (*Viscum album* L.) proteins, one thousand individual callus lines were assayed for their protein content by means of SDS-PAGE. The observed somaclonal variation, in the aspect of both the quantitative and the qualitative mistletoe protein production was relatively low (8%), indicating for the first time the possibility of *in vitro* production of standardized extracts of cytotoxic/immunomodulatory proteins, whereas future investigations could lead to a significant production of novel products with possible anticancer properties.

We initiated callus cultures of mistletoe (*Viscum album* L.) by inoculating leaf and stem explants on a Murashige and Skoog medium supplemented with different combinations of growth regulators at various concentrations. The cultures were assayed for the accumulation of K, P, Ca and Mg. Both growth regulator treatment and explant source, as well as their interaction significantly affected the accumulation of all macronutrients. For stem-derived calli, application of 4.65 μM Kin was superior to other PGR treatments leading to the maximum *in vitro* accumulation of the selected macronutrients. In addition, the average accumulation *in vitro* was higher in stem-derived callus cultures than in leaf-derived calli. Potassium, P and Ca accumulation *in vitro* was lower than in mistletoe plants and lower than in mistletoe hosts, such as fir, oak and chestnut. Mistletoe plants were able to accumulate K at a larger concentration than host species. Except for Ca, accumulation of macronutrients in stem-derived callus cultures was highly correlated with dry weight concentration. A high positive correlation was also observed among K, P and Mg concentration, while Ca accumulation was relatively high and positive correlated with Mg. On the contrary, in leaf-derived cultures a relatively high positive correlation was observed only between K and Mg concentration.

The addition of ascorbic acid to the culture medium affected significantly the accumulation of P and Ca in stem-derived calli and the accumulation of K and Mg in leaf-derived calli. However, Ca concentration in leaf-derived calli and Mg concentration in stem-derived calli was decreased after ascorbic acid addition.

Finally, the concentration of the selected macronutrients fluctuated during a total incubation period of ten weeks on MS + 4.95 μM NAA, with an increasing trend

after the eighth week. Results are discussed in view of the possible metabolic pathways requiring the studied macronutrients, as well as improving culture of mistletoe *in vitro*.

In order to study the pattern of *in vitro* accumulation of selected micronutrients in mistletoe (*Viscum album* L.) callus cultures, we inoculated leaf and stem explants on a Murashige and Skoog medium supplemented with different combinations of plant growth regulators at various concentrations. The accumulation of Mn, Zn, Cu and B in mistletoe callus cultures was significantly affected by both PGR treatment and explant source, as well as their interaction. However, neither of these factors affected Fe accumulation in a statistically significant sense. The average concentration of Fe, Mn, Zn and Cu *in vitro* was higher in stem-derived callus cultures than in leaf-derived calli, and much higher than in mistletoe plants and in mistletoe hosts, such as fir, oak and chestnut. For stem-derived calli and with the exception of B, application of 4.65 μM Kin was superior to other PGR treatments leading to the maximum *in vitro* accumulation of the selected micronutrients. Except for B, the accumulation of micronutrients in stem-derived callus cultures was highly correlated with dry weight concentration; a high positive correlation was also observed among Fe, Mn, Zn and Cu concentration, while B accumulation was slightly negatively correlated with the other micronutrients. On the contrary, in leaf-derived cultures a high positive correlation was observed only between Mn and Cu concentration.

The concentration of the selected micronutrients fluctuated during a total incubation period of ten weeks on MS + 4.95 μM NAA, with an increasing trend after the eighth week (B concentration being again an exception).

Finally, the addition of ascorbic acid to the culture medium generally promoted micronutrient accumulation, in particular Mn and Cu in stem-derived cultures and Fe, Zn and B in leaf-derived calli. This effect was correlated with an increase in total free phenolics substances, and further discussed in view of various plant antioxidant systems *in vitro*.

In an attempt to define the optimal conditions for mistletoe (*Viscum album*) protoplast isolation, we studied the effects of cell wall digestion treatments in leaf pieces and leaf-derived calli of mistletoe. A maximum number of 67×10^4 viable protoplasts g fw^{-1} tissue were obtained by digesting mistletoe leaves in a solution containing 0.016% pectinase and 0.007% cellulase.

Continuing our study, 1.000 calli of mistletoe were derived from 200 mistletoe stems which have been cultured in Murashige and Skoog (MS + 10 mg L^{-1} ascorbic acid + 4.95 μM NAA + 2.82 μM BA). The purpose was to evaluate the produced protein concentration of the calli.

The evaluation of protein concentration was according to Bearden method (Bearden, 1978) and the SDS-PAGE electrophoresis according to Laemmli (1979), using a 10% poly-acrylamide discontinuous gel. It was proven that the average range of the concentrated protein per callus was $1.178 \pm 0.058 \mu\text{g/g f.w.}$ (fresh weight). Electrophoresis showed 5 standard proteins of 53, 76, 116 and 170 kDa (Olsnes, 1982; Vester, 1977). The same proteins appeared also to be in donor plants plus one more at: 212 kDa.

In forty callus lines appeared 5 more proteins: 2 of them were smaller than 53 kDa, one was at 100 kDa and one at 150 Da.

Secondary metabolism is a close factor of cell differentiation. This fact allows the possibility of the highly production of proteins derived from somaclonal callus variation. Somaclonal variation in the qualitative aspect was 8%. Variation in

quantitative terms was high and in 10% of the calli a protein concentration six times higher than in stems was observed. These results approved for the first time the possibility of applying tissue culture for the production of mistletoe protein extracts with increased antitumor/immunomodulatory properties.

In the following, bioassay experiments were done for the comparison and the verification of the action and the properties between the donor plants' proteins and the somaclonal calli 's proteins. So, first of all they were tested for their toxicity in three normal cell lines and in two cancer cell lines. In normal cell lines, toxicity was high for the donor plants' proteins, while somaclonal calli's proteins were not. In cancer cell lines toxicity was high for all concentrations and for all proteins.

More bioassays were took part for the verification of action of proteins in cell function as concerning F.R.O. (Free radicals of oxygen), mitochondrial function, mitochondrial isolation (measurements of mitochondrial potential membranes, cellular oxidase C) in VERO normal cell line and in PC12 cancer cell line.

Finally, the results of this study, prescribe, for the first time, a whole approach for the tissue culture of *Viscum album* and for the standardization of cell factors in order to produce lectins and other products (mainly proteins) for anticancer use. Specially, the standardization of the production of protein (lectins and other) from somaclonal callus, is a special opportunity for the scientific society to study. Of course, further studies and assays should take place, in order to expand the uses and applications of these results. Continuing the assays in vitro and especially in vivo should give new prospects.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΟΥ *VISCUM ALBUM L.*

1.1.1. Βοτανική Ταξινόμηση-Περιγραφή

Το φυτό *Viscum album*, γνωστό στην Ελλάδα ως ιξός, μελιά, βίσκο ή γκι (από το γαλλικό *gui*), είναι ένας αειθαλής, δίοικος θάμνος που αναπτύσσεται σαν ημιπαράσιτο πάνω σε κλαδιά διαφόρων δέντρων, όπως το έλατο, η μηλιά, η λεύκα, η κοινή μουσμουλιά, η ιτιά, και πιο σπάνια η αγλαδιά κι η βελανιδιά. Ανήκει στην οικογένεια *Loranthaceae* και το γένος *Viscum*, το οποίο περιλαμβάνει 60-70 είδη αειθαλών, ανθεκτικών θάμνων (Grieve, 1994).

Γενικά, τα φυτά που ανήκουν σε αυτό το είδος (*Viscum album L.*) είναι διαδεδομένα σε όλη την Ευρώπη, την Ασία και την Β. Αφρική και μπορούν να βρεθούν εύκολα, αλλά όχι σε μεγάλους πληθυσμούς.

Σχηματίζει στρογγυλό θάμνο διαμέτρου 0,5-1,7 μέτρα, με πράσινα κι αντίθετα κλαδιά και αντίθετα, τα φύλλα του είναι αντίθετα, άμισχα, πράσινα, δερματώδη, επιμήκη, λογχοειδή, με 3-6 νευρώσεις με διχοτόμο ή τριχοτόμο αρθρωτή διακλάδωση, ενώ τα άνθη του είναι μικρά, κιτρινοπράσινα, σε συστάδες των τριών – πέντε, επιφυή, μασχαλιαία και διακρίνονται σε αρσενικά και θηλυκά, που βρίσκονται πάνω σε ξεχωριστά φυτά. Ανθίζουν από Μάρτιο έως Μάιο. Τα θηλυκά σχηματίζουν μικρούς λευκούς στρογγυλούς καρπούς, μονόσπερμους (σπανίως δίσπερμους), που ωριμάζουν το Δεκέμβριο (Grieve, 1994).

Στη φύση διαδίδεται αποκλειστικά από σπόρο που μεταφέρεται με τη βοήθεια των πουλιών (κυρίως της τσίχλας). Τεχνητά μπορεί να διαδοθεί προσκολλώντας σπόρο μέσα στον ιστό ενός κλαδιού του δέντρου ξενιστή. Ο κύκλος ζωής του *V. album* είναι δυνατόν να περιγραφεί αρχίζοντας από την αναπαραγωγή του σπόρου έως την βλάστηση των φύλλων. Από το φυτό ξενιστή παίρνει όλα τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και απορροφά νερό, ενώ τα οργανικά μπορεί και τα φωτοσυνθέτει μόνο του. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα οργανικά συστατικά του ιξού είναι τελείως διαφορετικά από εκείνα του ξενιστή του. (Grieve, 1994; Becker, 1986; 2000).

Η αναπαραγωγή του ιξού είναι πολύ δύσκολη, λόγω της ημιπαρασιτικής φύσης του φυτού. Αν και υπάρχει επάρκεια φυσικού προϊόντος, οι ιδιότητες των εκχυλισμάτων εξαρτώνται άμεσα από τις διαδικασίες παραγωγής, τον ξενιστή και την περίοδο συγκομιδής. Επειδή η σταθερότητα του προϊόντος (παραγωγή συγκεκριμένου ποιοτικά αλλά και ποσοτικά προϊόντος) είναι πολύ βασικό θέμα (Wagner, 1986), θα μπορούσε να λυθεί με την ιστοκαλλιεργητική παραγωγή κάλων ιξού και την προετοιμασία εκχυλισμάτων από αυτούς με συγκεκριμένα πρωτόκολλα. Έως πριν από την παρούσα μελέτη, δεν υπήρχαν ιδιαίτερα εστιασμένα πειράματα σε αυτήν την κατεύθυνση. Οι Becker & Schwarz (1971) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την πιθανότητα χρήσης των κάλων του ιξού ως πηγή βιοενεργών προϊόντων. Το 1990 οι Fukui et al. ανέφεραν την πρώτη παραγωγή κάλων από φύλλα του είδους *V. album* var. *Lutescens* στους οποίους διέκριναν 2 –δεσμευμένης με λακτόζη- λεκτίνες, όμοιες με αυτές που υπάρχουν στα φύλλα του φυτού. Επίσης διαπίστωσαν ότι η επαφή μεταξύ κάλου του ιξού και κάλου από το φυτό ξενιστή-οξιά (*Fagus crenata*) δεν κατέληξαν σε επαφή παρεμπόδισης ή αλληλεπίδρασης για κανένα από τα δύο είδη. Η μελέτη τους αυτή εστιάστηκε περισσότερο στη διαπίστωση της παραγωγής ή όχι

ουσιών όμοιων με το φυτό από τους κάλους κι όχι τόσο στην καταγραφή και τεκμηρίωση ιστοκαλλιεργητικών πρωτοκόλλων.

1.1.2. Οικονομική Σημασία – Χρήσεις

Ο ιζός αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο και βλαβερό ημιπαράσιτο για ένα μεγάλο φάσμα καλλωπιστικών και οικονομικής σημασίας φυτών (όπως οπωροφόρα δέντρα), γιατί τα καταστρέφει. Παράλληλα όμως αποτελεί μία πολύτιμη πηγή ενδιαφέροντος για φυτοπαθολόγους, καλλιεργητές, δασολόγους και ιατρικούς ερευνητές (Barney, 1998).

Αποτελεί εξαιρετική κτηνοτροφική ουσία. Λόγω της δηλητηριώδους φύσης του έτυχε περαιτέρω εκμετάλλευσης για την κατασκευή μαχαιριών, ενώ αργότερα έγινε γνωστή η χρήση του για την θεραπεία διαφόρων νευρολογικών, καρδιακών κι άλλων ασθενειών. Σήμερα ο ιζός συγκαταλέγεται μεταξύ των περισσότερο χρησιμοποιούμενων εναλλακτικών θεραπειών για τον καρκίνο. Θεωρείται ότι διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και επηρεάζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων και της κυτταρικής απόπτωσης. Χρησιμοποιείται και στην πρόληψη του καρκίνου σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, όπως ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας, θηλωμάτωση της ουροδόχου κύστης και πολύποδα παχέος εντέρου.

Η θεραπεία του καρκίνου με το εκχύλισμα του ιζού εφαρμόστηκε στην Ευρώπη για πάνω από έξι δεκαετίες σε χιλιάδες ασθενείς. Τα πρώτα ιατρεία τα οποία εφάρμοσαν τη χορήγησή του σε καρκινοπαθείς ξεκίνησαν το 1920 στην Γερμανία και στη Σουηδία και ήταν στα πλαίσια ανθρωποσοφικών ιατρείων με βάση τις αρχές της Ομοιοπαθητικής. Τα εκχυλίσματα του φυτού χρησιμοποιούνται κυρίως ως ενέσεις. Μόνο στη Γερμανία υπολογίζεται ότι δαπανώνται κάθε χρόνο για τα φαρμακευτικά παράγωγά του περισσότερα από 30 εκατομμύρια δολάρια. Μελέτη σε Γερμανούς ιατρούς έδειξε ότι το 45% από αυτούς έχει συνταγογραφήσει το σκεύασμα σε ασθενείς. Διερευνάται επίσης η χρησιμότητά του στην θεραπεία ασθενών με AIDS.

Μία συστηματική ανασκόπηση 26 μελετών από 13 χώρες, το 1998, έδειξε ότι το 31% ασθενών που πάσχουν από καρκίνο χρησιμοποιούν συμπληρωματικές και εναλλακτικές μορφές θεραπείας, ενώ κάποιες άλλες μελέτες έδειξαν ότι αυτό το ποσοστό μπορεί να φτάσει και το 60%-70% (Ring, 2001).

Υπάρχουν διάφορες προετοιμασίες των εκχυλισμάτων του ιζού, σε πολλές χώρες, εναντίον διαφορετικών ειδών καρκίνου. Τα πιο γνωστά κι ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα *Iscador* (*Iscar*), *Helixor*, *Iscucin*, και *Isorel*.

Το *Iscador* και το *Helixor*, που έχουν άδεια φαρμάκου, φτιάχνονται από φυτά που μεγαλώνουν σε διαφορετικούς ξενιστές, όπως βελανιδιά, μηλιά, πεύκο, και έλατο και χορηγούνται σε διαφορετικά είδη καρκίνων. Μερικές από τις προετοιμασίες του *Iscador* περιλαμβάνουν επίσης μέταλλα όπως ασήμι, χρυσό και χαλκό. Έχει εγκριθεί για χρήση στην Αυστρία, Ελβετία, και Δυτική Γερμανία. Επίσης χρησιμοποιείται στην Γαλλία, Ολλανδία, Ανατολική Ευρώπη, Βρετανία και Σκανδιναβία. Υποστηρικτές της θεραπείας ισχυρίζονται ότι το 1978 σχεδόν 2,000,000 αμπούλες πωλήθηκαν σε χώρες όπου το *Iscador* συνταγογραφείται και πάνω από 30,000 ασθενείς θεραπεύονται κάθε χρόνο. Το *Iscador* παρασκευάζεται από την Verein fuer Krebsforschung (Cancer Research Association), έναν μη κερδοσκοπικό οργανισμό στο Arleseim της Ελβετίας. Στη Σουηδία και στη Γερμανία

παρασκευάζεται από την Weleda AG, ενώ στις ΗΠΑ εισάγεται από την Weleda Inc. με την εμπορική ονομασία *Iscar* (με έγκριση από το FDA).

Το *Iscusin-Viscum* περιέχει ιξό από οκτώ διαφορετικούς ξενιστές και παράγεται ακολουθώντας συγκεκριμένη διαδικασία. Η αποστείρωση επετεύχθη με την προσθήκη ολιγοδυναμικού αργύρου. Χρησιμοποιείται σε πρώιμα στάδια καρκίνου, μετεγχειρητική προστασία όγκου, εγχειρήσιμους όγκους, και μη εγχειρήσιμους όγκους. Κάθε μία από τις οκτώ παρασκευές (ανάλογα με τον ξενιστή) έχει τις δικές του ενδείξεις. Το *Iscucin* παράγεται και διατίθεται (διανέμεται) από την Wala-Heilmittel GmbH, Germany.

Το *Isorel* είναι ένα υδατικό εκχύλισμα από βλαστούς του ιξού, τα υποείδη του ελάτου (*Isorel A*), μηλιάς (*Isorel M*) και πεύκου (*Isorel P*) σε κάθε περίπτωση. Συνήθως απευθύνεται στη ιατρική ή φαρμακευτική αγωγή για την θεραπεία των κακοηθών όγκων, στην μετεγχειρητική κατάσταση και στις περιπτώσεις υποτροπής και προφύλαξης από μεταστάσεις, θανάσιμων ασθενειών του αιμοποιητικού συστήματος και καθορισμένων προκαρκινικών σταδίων. Το *Isorel A* αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία αρρένων ασθενών, ενώ το *Isorel M* είναι το αντίστοιχο για τις γυναίκες ασθενείς. Το *Isorel* παράγεται και παρασκευάζεται από τη Novipharm (Austria).

Παρασκευή εκχυλισμάτων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία: Το *Isador* παρασκευάζεται από ιξό που προέρχεται από διάφορα είδη ξενιστών, όπως μηλιά, έλατο, πεύκο, βελανιδιά και είδη φτελιάς (CA, 1983). Η παρασκευή του περιλαμβάνει τη ζύμωση από τα διαφορετικά αυτά είδη, ενώ το προερχόμενο από το κάθε είδος εκχύλισμα ακολουθεί συγκεκριμένη διαδικασία, ανάλογη με το είδος του δέντρου (Ontario, 1994). Μερικά από τα παρασκευάσματα αυτά περιέχουν επίσης μέταλλα, όπως ασήμι, υδράργυρο και χαλκό. Τα εκχυλίσματα αυτά μετά την ζύμωση, περιέχουν μεγάλο αριθμό νεκρών και ζωντανών βακτηρίων και μερικές ζύμες (λίγη ζύμη) (U.S. Congress, 1990). Απαγορεύεται να φτιάχνει κανείς μόνος του εκχύλισμα, γιατί μπορεί να είναι πολύ δηλητηριώδες (Ontario, 1994). Αρκετές μελέτες με έτοιμα παρασκευάσματα, έδειξαν ότι ανεβάζουν την θερμοκρασία του σώματος 2.3°C έως 2.4°C βαθμούς την ημέρα των ενέσεων, όπως επίσης προκαλούν προσωρινούς πονοκεφάλους και ρίγη που συνδέονται με τον πυρετό που προκαλεί. Το κόστος της θεραπείας διαφέρει από μέρος σε μέρος και αποτελεί μέρος των εξόδων του γενικότερου προγράμματος θεραπείας που εφαρμόζεται (U.S. Congress, 1990).

Τα παρασκευάσματα '*Isorel*' διακρίνονται ανάλογα με τον ξενιστή από τον οποίο προέρχονται σε *Isorel A* όταν προέρχεται από έλατο, σε *Isorel M* όταν προέρχεται από μηλιά και σε *Isorel P* όταν προέρχεται από πεύκο. Σε κάθε ένα από τα παραπάνω παρασκευάσματα 1 ml ενέσιμου διαλύματος περιέχει υδατικό εκχύλισμα από 60 mg ολόκληρων βλαστών ιξού. Κάθε εκχύλισμα ακολουθεί διαδικασία σταθεροποίησης και τελικούς ελέγχους ποιότητας που εγγυώνται το τελικό προϊόν. Για την παρασκευή του προϊόντος γίνεται προσεκτική επιλογή της πρώτης ύλης και όλοι οι χειρισμοί επεξεργασίας που ακολουθούνται είναι ιδιαίτερα προσεκτικοί, ώστε να μην αλλοιωθεί το φυσικό προϊόν, να παραμείνουν ενεργές οι πρωτεΐνες και η υψηλή βιολογική του δράση. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η υψηλή ποιότητα του τελικού προϊόντος, το οποίο παρουσιάζει επιλεκτική κυτταροστατική δράση και διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα, γεγονός που καθιστά το προϊόν μοναδικό, σε σχέση με άλλες θεραπείες, καθώς συνδυάζεται και με το ότι δεν εμφανίζει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Κυκλοφορεί σε μέση συσκευασία των 8 αμποουλών του 1 ml και μεγάλη συσκευασία των 50 αμποουλών του 1 ml. Η διάρκεια ζωής αυτών των σκευασμάτων είναι δύο χρόνια (www.geocities.com)

Το *Helixor* είναι ένα υδατικό κρύο εκχύλισμα από φρέσκο ιξό, που προέρχεται από έλατο, πεύκο, και μηλιά. Απομονώθηκαν διάφορα συστατικά με διαφορετικές πιθανές επιδράσεις όπως: *λεκτίνες*, *βισκοτοζίνες*, *αλκαλοειδή* κ.α. με κύριες ενδείξεις την ογκολογική θεραπεία και την διέγερση του μυελού των οστών. Εγκυμοσύνη, υπερθυρεοειδισμός και δυσανεξία είναι αντενδείξεις. Ανάλογα με το είδος και το στάδιο του όγκου, η θεραπεία βασίζεται σε ρυθμικό πρόγραμμα για περίοδο από πέντε χρόνια έως και μία ζωή (Kast, 1990).

Η *in vitro* επίδραση των τριών παρασκευασμάτων του *Helixor* από τον ιξό με διαφορετικούς ξενιστές σε κυτταρικές καλλιέργειες ανθρωπίνων λευκοκυττάρων (κυτταρική σειρά Molt 4), έδειξε ότι μετά από 72 ώρες θεραπείας το παρασκεύασμα από ιξό που προερχόταν από τον ξενιστή μηλιά (*Malus*) έδειξε την ισχυρότερη επίδραση στην αύξηση και βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς, ενώ αυτό που προερχόταν από το έλατο (*Abies*) έδειξε επίδραση αλλά μικρότερης ισχύος και αυτό που προερχόταν από το πεύκο (*Pinus*) προκάλεσε αδύνατη επίδραση ακόμη και στις υψηλότερες δόσεις (Hulsen, 1986).

Το *Helixor* διατίθεται σε συσκευασία των 7 αμπουλών. Ως ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να παρατηρηθούν τοπικές αντιδράσεις, ενώ ο πυρετός είναι επιθυμητός. Το *Helixor* αναπτύχθηκε από το τμήμα 'θεραπεία λευχαιμίας και καρκίνου' του Gemein-schaft Fischermuhle e. V. στο Rosenfeld, FRG και χρησιμοποιείται από το 1968. Παράγεται και διανέμεται από την Helixor Heilmittel GmbH & Co. Η αρχή της αντικαρκινικής θεραπείας με *Helixor* βασίζεται στην ανθρωποσοφική ιατρική. Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για την φαρμακοδυναμική, φαρμακοκινητική και τοξικότητα του παρασκευάσματος *Helixor*. Οι *in vitro* μελέτες έδειξαν κυτταροστατική δράση σε μεμονωμένες κυτταρικές σειρές, ενώ τα πειράματα σε ζώα έδειξαν αντιφατικά αποτελέσματα. Οι μελέτες που έγιναν και αφορούσαν τη δράση του *Helixor* στο αυτοάνοσο σύστημα και την επίδραση στην λειτουργία του, δεν ήταν ιδιαίτερα διαφωτιστικές. Έως τώρα, καμία μελέτη δεν αποδεικνύει τεκμηριωμένα την κλινική του δράση εναντίων των όγκων (Kast, 1990).

Το παρασκεύασμα που ονομάζεται *Iscucin* προέρχεται από ιξούς οκτώ διαφορετικών ξενιστών και παράγεται σύμφωνα με μία ειδική 'ρυθμική' διαδικασία και επιπροσθέτως 'δυναμική'. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται με την προσθήκη ολιγοδυναμικού αργύρου. Οι ενδείξεις που έχουν δοθεί αφορούν προκαρκινικές καταστάσεις, , μετεγχειρητική αντικαρκινική θεραπεία, χειρουργημένους όγκους και μη χειρουργήσιμους όγκους (Kast, 1990). Κάθε ένα από τα οκτώ παρασκευάσματα (ανάλογα με το δέντρο-ξενιστή) έχει τη δική του λίστα με ενδείξεις.

Το *Iscucin* χορηγείται ενέσιμα. Η έγχυση γίνεται κοντά στο σημείο του όγκου μεταξύ 5 και 7 p.m. Η δόση κι η συχνότητα εξαρτώνται από την θερμοκρασία του σώματος. Ο Koehler ξεκίνησε ν' αναπτύσσει τη θεραπεία με *Iscucin* το 1958, κατόπιν προσωπικής επικοινωνίας με τον Steiner από το 1924.

Παράγεται και διανέμεται από την Wala-Heilmittel GmbH, Eckwalden. Δεν είναι εγκεκριμένο στην Ελβετία (IKS) (Kast, 1990).

1.1.3. Είδη - Ξενιστές

Η λέξη ιξός (mistletoe) απευθύνεται σε φυτά με παρόμοιο ημιπαρασιτισμό και συγκεκριμένο βαθμό ταξινομικής σχέσης σε τρεις οικογένειες: *Loranthaceae*, *Viscaceae* και *Eremolepidaceae*. Εξάιρεση αποτελούν τα γένη *Nuytsia*, *Atkinsonia* και

Gaiadendron των οποίων οι παρασιτικές ρίζες παρασιτούν σε αέριους βλαστούς άλλων ανώτερων φυτών.

Ανάλογα με το είδος του ξενιστή ο Ευρωπαϊκός πληθυσμός του φυτού χωρίζεται σε τρία υποείδη: α) *Viscum album* L. ssp. *platyspermum* Kell. (=ssp. *album*) όταν αναπτύσσεται σε δικοτυλήδονα δέντρα, β) *Viscum album* L. ssp. *abietis* Beck. όταν αναπτύσσεται σε *Abies* sp. και γ) *Viscum album* L. ssp. *laxum* fiek (=ssp. *Austriacum*) (Wiesb. Vollmann) όταν αναπτύσσεται σε πεύκα και πολύ σπάνια σε ερυθρελάτη (κωνοφόρα) (Becker, 1986).

Είδη του ιξού συναντώνται και στην Αμερική γνωστό ως *Phoradendron leucarpum* (στις ΗΠΑ) και στην Κορέα, γνωστό ως *Viscum album coloratum*.

Οι καταγεγραμμένοι ξενιστές του *Viscum album* περιλαμβάνουν περισσότερα είδη από οποιοδήποτε άλλο ιξό, συμπεριλαμβανομένου και του *Dendrophthoe falcata* (είδος ιξού που αναπτύσσεται στην Ινδία και Νοτιοανατολική Ασία), με αποτέλεσμα το *Viscum album* εμφανίζεται να έχει 401 ξενιστές σε 227 γένη και 77 οικογένειες. Οι αναφορές για τους ξενιστές του *Viscum album* φτάνουν τις 4500 δημοσιεύσεις, από τις οποίες τουλάχιστον οι 630 αναφέρονται στις σχέσεις του με το είδος των ξενιστών του. Στην μελέτη των Barney et al. (1998) αναφέρονται 452 είδη ξενιστών σε Ευρώπη, Ασία και Καλιφόρνια, από τα οποία ως αυτογενώς μεταδιδόμενα είδη στην Ευρώπη αναφέρονται 384 σε φυλλοβόλα δέντρα, 10 σε ξύλο ελάτης και 16 σε ξύλο πεύκης. Από τα είδη ξενιστών του ιξού που κατανέμονται στην Ευρώπη τα 190 (55%) βρίσκονται σε δέντρα ή θάμνους κι αποτελούν ξεχωριστά είδη, ενώ σε ξύλο ελάτης καταγράφονται 2 ξεχωριστά είδη και 3 σε ξύλο πεύκης.

Γενικά, η οικογένεια *Rosaceae* περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη ξενιστών του *Viscum album* (128), ενώ η οικογένεια *Salicaceae* περιλαμβάνει 63 ξενιστές αλλά και το γένος με τους περισσότερους ξενιστές (γένος *Salix* με 35 είδη ξενιστών). Άλλα γένη στα οποία πολύ συχνά παρασιτεί είναι τα: *Populus* (28 ξενιστές), *Acer* (25 ξενιστές), *Malus* (25 ξενιστές), *Prunus* (25 ξενιστές), και *Crataegus* (24 ξενιστές). Από τα είδη της ελάτης στα οποία παρασιτεί ο ιξός οι περισσότεροι ξενιστές ανήκουν στο γένος *Abies* (16 από σύνολο 19), ενώ από τα είδη πεύκης (σύνολο 26 ξενιστών) οι περισσότεροι ανήκουν στο γένος *Pinus* (16 ξενιστές - οι 7 προέρχονται από εμβολιασμό-). Για το γένος *Pinus* παρατηρήθηκε (Lopez Saez and Sanz de Bremond, 1992) ότι το είδος *Pinus pinea* L. δεν παρασιτείται από τον ιξό, ακόμη κι όταν περιτριγυρίζεται από φυτά ιξού σε καρποφορία.

Στην Ελλάδα βρίσκεται συχνά πάνω σε διάφορα δεντρώδη είδη κυρίως έλατα (γένος *Abies*), αλλά και λεύκες (γένος *Populus*), γηραιές αγριομηλιές (γένος *Malus*), φλαμουριές (γένος *Tilia*), πεύκα (γένος *Pinus*), μουσμουλιές (γένος *Crataegus*), ψευδοακακίες (γένος *Robinia*), ιτιές (γένος *Salix*), και σπανιότερα σε καστανιές (γένος *Castanea*, *Aesculus*), και βελανιδιές (γένος *Quercus*).

Στη Βόρεια Ελλάδα είναι δυνατόν να βρεθεί σε οπωροφόρα δέντρα και δασικά είδη, ενώ στη Νότια Ελλάδα σχεδόν αποκλειστικά σε έλατα.

1.2. ΙΣΤΟΡΙΑ

Το λατινικό όνομα του γένους *Viscum* σημαίνει κολλώδες, και προήλθε από το κολλώδες (ιξώδες) του χυμού των καρπών του γκι. Στη Γαλλία το φυτό ονομάζεται και 'φυτό του σταυρού' γιατί, σύμφωνα με έναν παλιό μύθο, ο σταυρός ήταν φτιαγμένος από αυτό το ξύλο (Grieve, 1994).

Ο Ιπποκράτης συνιστούσε την χρήση του για θεραπεία των παθήσεων του σπλήνα. Οι Δρυίδες συνήθιζαν να το κόβουν από τα δέντρα με ένα χρυσό δρεπάνι στην αρχή του χρόνου, ακολουθώντας τα οράματά τους,. Πίστευαν ότι το φυτό τους προστάτευε από κάθε κακό κι έφερνε γούρι. Αυτό επικράτησε και στην Ελλάδα, γι' αυτό συνηθίζεται Χριστούγεννα και Πρωτοχρονιά τα σπίτια να στολίζονται με κλαδιά από ιξό. Σύμφωνα με ένα Σκαδιναβικό μύθο ο Μπάλντερ, ο Θεός του πολέμου, φονεύθηκε με ένα τόξο φτιαγμένο από ιξό. Αργότερα θεωρήθηκε σύμβολο του έρωτα.

Λόγω της δηλητηριώδους φύσης του χρησιμοποιήθηκε και για την κατασκευή μαχαιριών ως εκμεταλλεύσιμων αμυντικών μέσων. Κατά το 16^ο αιώνα, χρησιμοποιούταν για την θεραπεία της επιληψίας και άλλων νευρολογικών παθήσεων, ενώ μετέπειτα χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία πολλών άλλων νόσων όπως της αρτηριακής υπέρτασης, της κεφαλαλγίας, της ταχυκαρδίας, της στειρότητας, των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και της αρθρίτιδας (Ring, 2001).

Ο ιξός εισήχθη στη θεραπεία του καρκίνου το 1917. Ο Rudolf Steiner (1861-1925), ιδρυτής της Εταιρείας Έρευνας Καρκίνου (Society for Cancer Research), στο Arleseim της Ελβετίας, ήταν ο πρώτος που ανέφερε τις άνοσο - βελτιωτικές ιδιότητες του ιξού, και πρότεινε την χρήση του σαν μια επιπλέον θεραπεία στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Υποστήριζε ότι η παρασιτική φύση και τα άλλα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του ιξού το καθιστούν μοναδικής σημασίας για την αντιμετώπιση της παρασιτικής ανάπτυξης του καρκίνου.

Η έρευνα για τον προσδιορισμό των δραστικών συστατικών του και για τον προσδιορισμό των αντικαρκινικών ιδιοτήτων του έχει πολλαπλασιαστεί από τότε που έγινε δημοφιλής η χρήση των εκχυλισμάτων του.

1.3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Πολλές έρευνες και μελέτες έχουν γίνει για τον προσδιορισμό και τον τρόπο δράσης των δραστικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα του ιξού. Οι περισσότερες έχουν επικεντρωθεί στα συστατικά που σχετίζονται με τις αντικαρκινικές του ιδιότητες. Τα κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων του ιξού είναι *βισκοτοζίνες*, *αλκαλοειδή* και *λεκτίνες*. Τόσο οι *βισκοτοζίνες*, όσο και οι *λεκτίνες* είναι πρωτεΐνες με τοξικές ιδιότητες, στις οποίες οφείλεται και η αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων του φυτού.

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του ιξού έχουν αποδοθεί τόσο στις κυτταροτοξικές πρωτεΐνες *βισκοτοζίνες* (μια ομάδα βασικών πολυπεπτιδίων 5 kDa) και τις τρεις ανοσοτροποποιητικές *λεκτίνες ML I, ML II* και *ML III*, όσο και σε άλλα, ως τώρα αταυτοποίητα, συστατικά του ανεπεξέργαστου παρασκευάσματος. Αποκαλύφθηκε πρόσφατα ότι τα εκχυλίσματα ιξού προάγουν τον αποπτωτικό θάνατο καλλιεργούμενων καρκινικών κυττάρων και λεμφοκυττάρων, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα και προστατεύουν το DNA έναντι της χημειοθεραπείας και της ακτινοβολίας (Stein, 1998; Werner, 1998; Büssing, 1998).

Θεραπευτικές ενδείξεις: Τα εκχυλίσματα του ιξού χρησιμοποιούνται εναντίον διαφόρων μορφών και σταδίων του καρκίνου. Συνήθως χρησιμοποιούνται παρασκευάσματα ολόκληρου ιξού, οπότε η δράση τους εξαρτάται από το δέντρο από το οποίο προέρχονται. Οι κυριότερες ενδείξεις αναφέρονται στην αντιμετώπιση πρώιμων σταδίων καρκίνου μετεγχειρητικής προστασίας όγκου, εγχειρήσιμους

όγκους, και μη εγχειρήσιμους όγκους. Η θεραπεία με *Iscador* αποδείχθηκε κλινικά και ανοσολογικά αποτελεσματική και με καλή ανεκτικότητα στα ανοσοκατεσταλμένα παιδιά με επαναλαμβανόμενες οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις, που οφείλονταν στο ατύχημα του Τσερνομπίλ (Lukyanova, 1992). Επίσης το *Iscador* έχει μια αυξημένη δράση κατά των κυττάρων του καρκίνου του μαστού και των κυττάρων του καρκίνου του εντέρου (Heiny, 1993). Οι επίσημες ενδείξεις για το *Iscucin* είναι: πρώιμα στάδια καρκίνου, μετεγχειρητική προστασία όγκου, εγχειρήσιμοι όγκοι, και μη εγχειρήσιμοι όγκοι. Το *Isorel* συνήθως απευθύνεται στη ιατρική ή φαρμακευτική αγωγή για την θεραπεία των κακοηθών όγκων, στην μετεγχειρητική κατάσταση και στις περιπτώσεις υποτροπής και προφύλαξης από μεταστάσεις, θανάσιμων ασθενειών του αιμοποιητικού συστήματος και καθορισμένων προκαρκινικών σταδίων. Το *Isorel A* αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία αρρένων ασθενών, ενώ το *Isorel M* είναι το αντίστοιχο για τις γυναίκες ασθενείς. Το *Isorel P* χρησιμοποιείται εναντίον του καρκίνου του δέρματος (του μελανώματος και του μελανωσαρκώματος), όγκων της γλώσσας, του λαιμού, των χειλιών, λεμφοκοκκιωμάτων, λέμφωμα non-Hodgkin και για τη διέγερση της λειτουργίας του μυελού των οστών. Το σημαντικό είναι ότι στους περισσότερους ασθενείς (αλλά και στα υγιή άτομα) η ποιότητα της ζωής τους αυξήθηκε σημαντικά (Novipharm, *Isorel therapy-An introduction*, 1998, www.geocities.com).

Σ' επίπεδο ουσιών η *Viscum*, μια *λεκτίνη* που δεσμεύει γαλακτοσίδη, αποτελεί ένα ισχυρό φλεγμονώδη μεσολαβητή που είναι σε θέση να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα (Heiny, 1994), ενώ η καθαρισμένη *λεκτίνη* (ML I) έχει ανοσορρυθμιστική δράση στην ενεργοποίηση μονοκυττάρων / μακροφάγων για φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Metzner, 1987).

Δοσολογία και μέθοδος χορήγησης: Η χορήγηση γίνεται κυρίως ενέσιμα, αν και μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με το είδος του εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιηθεί. Το *Iscador* συνήθως δίνεται με ένεση, αλλά μπορεί να δοθεί και από το στόμα. Η ενέσιμη θεραπεία τυπικά διαρκεί 14 ημέρες, με μία ένεση κάθε μέρα. Το *Iscucin* θεωρητικά πρέπει να εγχύεται κοντά στον όγκο μεταξύ 5 και 7 p.m. Η δοσολογία και η συχνότητα εξαρτάται από τη θερμοκρασία σώματος. Παρ' όλα αυτά δεν έχουν δημοσιευτεί προ-κλινικές μελέτες. Στο κλινικό πεδίο υπάρχουν μόνο μεμονωμένες περιπτώσεις που αναφέρονται, τέσσερις από αυτές έχουν λίγα δεδομένα και αποτελέσματα που μπορούν να ερμηνευθούν και χωρίς την χορήγηση του *Iscucin*. Η χορήγηση του *Isorel* γίνεται ενέσιμα υποδορίως.

Σε μελέτες που έγιναν σ' επίπεδο παραγόμενων ουσιών, οι *λεκτίνες* που απομονώθηκαν από το *Viscum album* ελέγχθηκαν σε όλες τις κυτταρικές σειρές του μελανώματος (συνολικά 11) και παρουσίασαν μια ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (αντιπολλαπλασιαστική δράση) σε συγκεντρώσεις των 1-10 ng/ml. Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της *βισκοτοζίνης* αυξάνεται σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 0,5-1 μg/ml, ενώ των *αλκαλοειδών* αρχίζει στα 10 μg/ml (Yoon, 1998). Παράλληλα, οι *λεκτίνες ML I, ML II και ML III*, μπόρεσαν σε συγκεντρώσεις από 0,02 έως 20/rg ml να ενισχύσουν την έκκριση παράγοντα νέκρωσης όγκων *κυτταροκίνης (TNF)-άλφα*, *ιντερλευκίνης (IL)-1 άλφα*, *IL-1 βήτα* και *IL-6* από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα (Ziska, 1998).

Προφυλάξεις: Σε γενικές γραμμές συνιστάται η θεραπεία να διακόπτεται κατά την έμμηνο ρύση και την εγκυμοσύνη. Σύμφωνα με μια έρευνα της Ελβετικής Ένωσης για τον καρκίνο, τα παρασκευάσματα *Iscador* που έχουν υποστεί ζύμωση περιέχουν μεγάλους αριθμούς νεκρών και ζωντανών βακτηρίων και κάποια ποσότητα ζύμης.

Τα σπιτικά παρασκευάσματα ιξού μπορεί να είναι πολύ δηλητηριώδη. Η κατανάλωση τοξικών δόσεων του ολόκληρου φυτού ή των καρπών του ιξού μπορεί να επιφέρει σπασμούς, βραδυκαρδία, αστάθεια της αρτηριακής πίεσης, εμετούς και θάνατο. Παροδικά, μπορεί να εμφανιστούν ουλίτιδα, ηωσινοφιλία και αύξηση της ουρίας και της κρεατινίνης. Στις περιορισμένης σημασίας παρενέργειες που έχουν αναφερθεί, για το *Isorel*, περιλαμβάνεται μια ελαφρά αύξηση της θερμοκρασίας κατά 1 έως 1,5 °C κάτι που σταματάει μετά από 1 με 2 ημέρες. Όσον αφορά το *Helixor*, εάν η δοσολογία αυξηθεί απότομα, η θερμοκρασία ανεβαίνει κατά 1-1,5°C και μπορεί να εμφανιστεί πονοκέφαλος. Μέσα από κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στη ζυμωμένη μορφή του *Iscador* προέκυψε ότι οι ασθενείς έχουν πυρετό (αύξηση της τάξεως των 2,3 έως 2,4°C) κατά την ημέρα των ενέσεων. Οι τοπικές αντιδράσεις γύρω από τη σημείο της ένεσης, οι προσωρινοί πονοκέφαλοι και οι κρυάδες συνδέονται επίσης με τον πυρετό. Συνίσταται αναμονή έως την ομαλοποίηση της θερμοκρασίας πριν από κάθε νέα ένεση. Στην περίπτωση του υπερθυρεοειδισμού, συνίσταται οι ενέσεις να αρχίζουν με μικρές δοσολογίες και να αυξάνονται σταδιακά.

Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα και άλλες μορφές αλληλεπιδράσεων: Οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες του *Viscum album* έδειξαν πως ασκούν μια ραδιοπροστατευτική δράση η οποία θα μπορούσε να είναι ένα πολύτιμο συμπλήρωμα στην ακτινοθεραπεία του καρκίνου. Η δράση αυτή φαίνεται ότι είναι το αποτέλεσμα τόσο της δόσης ακτινοβολίας όσο και της δόσης φαρμάκου καθώς και του χρόνου χορήγησης. Η μέγιστη ραδιοπροστατευτική αποτελεσματικότητα των πολυσακχαριτών παρατηρήθηκε μετά τη χορήγησή τους 15 λεπτά πριν από την ακτινοβολία (Stein, 1999).

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες: Η τιμή LD₅₀ για τις λεκτίνες στον ποντικό κυμαίνεται μεταξύ 30-50 μg/kg, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τις βισκοτοζίνες είναι 500 μg/kg (Samuelsson, 1996).

Προ-κλινικά Δεδομένα: Αρκετές προ-κλινικές μελέτες έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια, όσον αφορά νέες ενδείξεις για εκχυλίσματα ή ουσίες που προέρχονται από τον ιξό. Μερικές από τις πιο σημαντικές μελέτες αναφέρονται στο *Iscador*, το οποίο σε σχετική μελέτη για το σάρκωμα, ανέστειλε καρκινογένεση που οφειλόταν σε 20-μεθυλοχολανθρίνη στα ποντίκια. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του *Iscador* (1 mg/δοσολογία) δύο φορές την εβδομάδα για 15 εβδομάδες μπορεί να αναστείλει πλήρως το σάρκωμα που οφείλεται σε 20-μεθυλοχολανθρίνη στα ποντίκια και να προστεύσει τα ζώα αυτά από θάνατο που οφείλεται σε καρκινικό όγκο. Το *Iscador* διαπιστώθηκε ότι είναι αποτελεσματικό ακόμα και σε μικρότερες δοσολογίες. Μετά από χορήγηση 0,166, 0,0166 και 0,00166 mg/δοσολογία το 67, 50 και 17% των ζώων αντιστοίχως, δεν ανέπτυξαν σάρκωμα (Kuttan, 1997). Στην ίδια μελέτη, οι μακροφάγοι από ποντίκια στα οποία εφαρμόστηκε θεραπεία με εκχύλισμα *Viscum album* αποδείχθηκε πως είναι ενεργοί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων στην καλλιέργεια. Αυτοί οι ενεργοποιημένοι μακροφάγοι έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν τα ποντίκια από ενδεχόμενο θάνατο λόγω προοδευτικών όγκων όταν χορηγούνται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση στα ζώα. Οι προφυλακτικές καθώς και οι πολλαπλές θεραπείες με μακροφάγους που έχουν ενεργοποιηθεί στο εκχύλισμα *Viscum album* αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικές σε σχέση με μια μεμονωμένη θεραπεία. Ως εκ τούτου, εκτός από την άμεση κυτταροτοξική δράση του *Viscum album*, η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να συμβάλλει στη γενική αντικαρκινική δραστηριότητα του φαρμάκου (Kuttan, 1997).

Στα ποντίκια, ένας αυξημένος αριθμός πλακωδών κυττάρων σε σχηματισμό πλάκας στα ερυθροκύτταρα (sheep red blood cells - SRBC) ακολούθησε την χορήγηση του *Isorel* (Novipharma, Austria) μαζί με SRBC. Περαιτέρω, ο χρόνος

επιβίωσης ενός ξένου δερματικού μοσχεύματος μειώθηκε στις περιπτώσεις όπου το *Isorel* χορηγήθηκε τη σωστή χρονική στιγμή. Τέλος, η καταπιεσμένη ανοσολογική αντίδραση σε όγκους σε ποντίκια επανακτήθηκε μετά τη χορήγηση του *Isorel*. Το *Isorel* διαπιστώθηκε επιπλέον ότι ασκεί κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*. Η εφαρμογή του σε ποντίκια που έπασχαν από καρκίνο μπορούσε να παρατείνει τη ζωή τους αλλά χωρίς καμία θεραπευτική δράση. Ωστόσο, ένας συνδυασμός της τοπικής ακτινοβολίας και του *Isorel* απεδείχθη εξαιρετικά αποτελεσματικός: κατόπιν μιας τοπικής ακτινοβολίας 43 Gy σε ένα μεταμοσχευμένο ινοσάρκωμα μεθυλοχολανθρίνης (όγκος περίπου 240 mm³) που αναπτυσσόταν σε γενετικά όμοια ποντίκια CBA/HZgr, ο όγκος εξαφανίστηκε σε ποσοστό περίπου 25% του συνόλου των ζώων. Η προσθήκη του *Isorel* αύξησε το ποσοστό των θεραπευμένων ζώων σε πάνω από 65%. Η συνδυασμένη δράση του *Isorel*, που επηρεάζει τη βιωσιμότητα του όγκου αφενός και την ανοσολογική αντίδραση αφετέρου, φαίνεται να είναι ευνοϊκή για την αντικαρκινική *in vivo* δράση (Pouckova, 1986).

Η εφαρμογή ενός υδατικού εκχυλίσματος από το *Viscum album coloratum*, από τον κορεάτικο ιξό, περιόρισε σημαντικά τη μετάσταση του καρκίνου στους πνεύμονες που οφειλόταν σε υψηλά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα ποντικών, μελάνωμα B16-BL6, καρκίνωμα του παχέος εντέρου 26-M3.1 και κύτταρα λεμφώματος L5178Y-ML25 σε ποντίκια. Η αντιμεταστατική δράση οφειλόταν στην καταστολή της ανάπτυξης του όγκου και την αναστολή της αγγειογένεσης που προκαλούνταν από τον όγκο με την επίδραση στο TNF-άλφα (Yoon, 1998).

Σε επίπεδο ουσιών η *λεκτίνη* του ιξού, *ML-A* αδρανοποιεί ριβοσώματα του ήπατος των ποντικών διαχωρίζοντας ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό στα A-4324 του 28 S rRNA των ριβοσωμάτων, καθώς είναι χαρακτηριστικό των κοινών πρωτεϊνών αδρανοποίησης ριβοσωμάτων (RIP) (Citores, 1993), ενώ η *λεκτίνη ML-I* από το *Viscum album* έδειξε ότι μπορεί να αυξάνει τον αριθμό και την κυτταροτοξική δραστηριότητα των φυσικών κυττάρων – φονιάδων και να διεγείρει την αντικαρκινική δραστηριότητα στα πρότυπα των ζώων. Η ίδια *λεκτίνη* αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων και προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένος θάνατος κυττάρων) σε αρκετούς τύπους κυττάρων (Janssen, 1993).

Αντικαρκινική δραστηριότητα: Τα εκχυλίσματα του *Viscum album L.* έχουν αποδειχθεί ότι διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ενεργοποιούν τα κύτταρα NK (natural killers), τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα T κύτταρα και διεγείρουν την απελευθέρωση των *κυτοκινών* (Ring, 2001). Επίσης, παρέχουν μια σταθεροποιητική δράση του DNA (Woynarowski, 1980) και ανασταλτική για την κυτταρική ανάπτυξη.

Οι δραστηριότητες αναστολής του πολλαπλασιασμού έχουν διαπιστωθεί σε χορήγηση των εκχυλισμάτων *Viscum album C*, *Viscum album Qu* και *Viscum album M* (εμπορική ονομασία *Iscador*) στις κυτταρικές σειρές μελανώματος. Το *Viscum album C* περιέχει *βισκοτοξίνη*, *αλκαλοειδή* και *λεκτίνες*. Το *Viscum album Qu* παρασκευάστηκε από την Medac (Γερμανία). Το *Viscum album M* έχει παρασκευασθεί από το Ινστιτούτο Hiscia (Ελβετία). Η δράση αναστολής του πολλαπλασιασμού που χαρακτηρίζει τα εκχυλίσματα σε 11 κυτταρικές σειρές μελανώματος που έχει ληφθεί μέσω του EORTC – MCG, ελέγχθηκαν σε δοκιμές πολλαπλασιασμού μονομοριακής στρώσης. Στις περισσότερες από τις κυτταρικές σειρές μελανώματος που εξετάστηκαν, το *Viscum album C* είχε σημαντική δράση αναστολής του πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση 100 µg/ml, ενώ το *Viscum album M* εμφάνισε δράση αναστολής του πολλαπλασιασμού στα 1000 µg/ml. Οι *λεκτίνες* που έχουν απομονωθεί από το *Viscum album C*, όταν συγκρίνονται μεταξύ τους εμφανίζουν σχεδόν και στις 11 κυτταρικές σειρές μελανώματος μια παρόμοια

ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού. Αυτό διαπιστώθηκε σε συγκεντρώσεις 1-10 ng/ml. Η ανασταλτική του πολλαπλασιασμού δράση της *βισκοτοζίνης* αυξάνεται στις συγκεντρώσεις των 0,5-1 µg/ml, ενώ η ανασταλτική δράση του πολλαπλασιασμού των αλκαλοειδών ξεκινάει στα 10 µg/ml (Yoon, 1998).

Οι ασθενείς που πάσχουν από προχωρημένη μορφή καρκίνου του μαστού και στις οποίες χορηγήθηκε το *Iscador* εμφάνισαν σημαντική βελτίωση, πιθανώς λόγω της διέγερσης των επιδιορθωτικών ενζύμων από *λεμφοκίνες* ή *κυτταροκίνες* που εκκρίνονται από λεμφοκύτταρα ή σε μια τροποποίηση στην ευπάθεια στους εξωγενείς παράγοντες που έχουν ως αποτέλεσμα πιο περιορισμένη ζημιά (Konacs, 1991).

Οι τρεις *λεκτίνες* του ιξού *ML I*, *ML II* και *ML III*, μπόρεσαν σε συγκεντρώσεις από 0,02 έως 20/µg ml (100-10.000-πλάσια χαμηλότερες από εκείνες που εμφανίζουν τοξική δράση) να ενισχύσουν την έκκριση παράγοντα νέκρωσης όγκων *κυτταροκίνης (TNF)-άλφα*, *ιντερλευκίνη (IL)-1 άλφα*, *IL-1 βήτα* και *IL-6* από τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που είχαν πολύ πιο αυξημένες τιμές ελέγχου. Οι ανοσοενεργοποιητικές συγκεντρώσεις από τις τρεις *λεκτίνες* διαπιστώθηκαν πως ήταν διαφορετικές για κάθε δότη. Στις τοξικές συγκεντρώσεις, τα ποσά του *IL-1 άλφα*, *IL-1 βήτα* και σε μικρότερο βαθμό του *TNF άλφα* στα υπερκείμενα υγρού μονοκυττάρων ήταν ιδιαίτερα υψηλά (Ziska, 1998).

Επίσης, το εκχύλισμα του κορεάτικου ιξού διαθέτει δραστηριότητα κατά των καρκινικών όγκων *in vivo* και *in vitro* (Yoon, 1998).

Δραστηριότητα κατά της λευχαιμίας: Η *λεκτίνη I* ιξού από το *Viscum album* η οποία εφαρμόστηκε *in vitro* για 1 ώρα στις κατάλληλες δοσολογίες, προκάλεσε μη αντιστρεπτή αναστολή του πολλαπλασιασμού λευχαιμικών κυττάρων L1210. Η τοξίνη φάνηκε να είναι κυτταροτοξική στα κανονικά προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, όπως παρατηρήθηκε στα λευχαιμικά κύτταρα P388 και L1210.

Το *Iscador* διαπιστώθηκε ότι μειώνει την λευκυτταροπενία που οφείλεται στην ακτινοβολία και τη θεραπεία κυκλοφοσφαμίδης στα ζώα. Η απώλεια βάρους λόγω της ακτινοβολίας ήταν σημαντική ενώ δεν σημειώθηκε καμία αλλαγή στην απώλεια βάρους λόγω της κυκλοφοσφαμίδης. Τα επίπεδα αιμογλοβίνης δεν επηρεάστηκαν, υποδεικνύοντας ότι η θεραπεία με το εκχύλισμα μειώνει την λεμφοκυτταροπενία και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με τη χημειοθεραπεία και τη θεραπεία ακτινοβολίας (Kuttan, 1997).

Σε παλαιότερη μελέτη είχε διαπιστωθεί ότι το *Iscador* ήταν κυτταροτοξικό σε διάφορες καρκινικές σειρές όπως σε κύτταρα ασκίτη λεμφώματος Dalton (κύτταρα DLA) και κύτταρα ασκίτη *Ehrlich in vitro* και πως μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη της ινοπλασίας των πνευμόνων (κύτταρα LB), των ωοθηκικών κυττάρων κινέζικου χάμστερ (κύτταρα CHO) και των ανθρώπινων κυττάρων ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (κύτταρα KB) σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η χορήγηση του *Iscador* διαπιστώθηκε ότι μειώνει τους όγκους ασκίτη και τους στερεούς όγκους που παράγονται από κύτταρα DLA και κύτταρα ασκίτη *Ehrlich*. Η δράση του φαρμάκου ήταν εμφανής όταν το φάρμακο χορηγούνταν είτε εκ παραλλήλου, μετά την ανάπτυξη του όγκου ή όταν χορηγούνταν στα πλαίσια της προφυλακτικής θεραπείας, φανερώνοντας έναν μηχανισμό δράσης πολύ διαφορετικό από άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Το *Iscador* δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση στα λεμφοκύτταρα (Luther, 1977).

Άλλα ιατρικά αποτελέσματα: Η συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων (SCE) 5-βρωμο-2'-δεοξουριδίνης των κυττάρων αμνιακού υγρού (AFC) παρέμεινε σταθερή μετά την προσθήκη θεραπευτικής συγκέντρωσης *Viscum album (Iscador P)* αλλά μειώθηκε σημαντικά μετά από τη χορήγηση σημαντικής ποσότητας φαρμάκων. Καθώς ο συντελεστής πολλαπλασιασμού παρέμεινε σταθερός,

ακόμα και σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου, η δράση αυτή δεν ήταν δυνατόν να αποδοθεί σε μια μείωση του πολλαπλασιασμού. Δεν διαπιστώθηκαν ενδείξεις κυτταρογενετικής βλάβης ή αποτελέσματα μεταλλακτικότητας μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων του *Viscum album L.* έδειξαν ότι μειώναν σημαντικά τη συχνότητα ανταλλαγής αδελφών χρωματιδίων (SCE) της φυτο-αιμογλουτινίνης (PHA) των περιφερειακών μονοπύρηνων κυττάρων αίματος (PBMC) υγιών ατόμων (Büssing, 1995).

Καθώς το *Iscador* προκαλεί την παραγωγή των φυσικών κυττάρων – δολοφόνων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση του αριθμού των κυττάρων T4 και ως εκ τούτου της κλινικής κατάστασης των HIV – θετικών ατόμων. Από τις εργαστηριακές δοκιμές προέκυψε ότι σημειώθηκε αναστολή της προόδου της λοίμωξης HIV (Rentea, 1981, Schink, 1997). Κατά τη διάρκεια μελέτης φάσης I/II για τον καθορισμό της δράσης του *Viscum album (Iscador)* στην μόλυνση από τον ιό HIV, σε 40 HIV-θετικούς ασθενείς (με μέτρηση CD4-λεμφοκυττάρων > 200) χορηγήθηκε με υποδόρια ένεση 0,01 mg έως 10 mg δύο φορές την εβδομάδα για μια περίοδο 18 εβδομάδων. Το εκχύλισμα έδρασε θετικά και φάνηκε ότι έχει δράση κατά του HIV (Gorter, 1994).

Σχετικές δράσεις με άλλες ενώσεις: Από το *Viscum album (VAA)* βρέθηκε ότι μια *λεκτίνη γαλακτόζης* προκαλούσε τη συσσωμάτωση ανθρώπινων αιμοπεταλίων κατά τρόπο που ήταν ανάλογος της δόσολογίας και του σακχάρου. Μικρές συγκεντρώσεις του VAA, που δεν προκαλούν συσσωμάτωση, διέγειραν την απόκριση των αιμοπεταλίων σε γνωστά συσσωματώματα (ADP, αραχιδονικό οξύ, θρομβίνη, ριστοκετίνη). Η συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που οφειλόταν σε VAA ήταν πλήρως αντιστρεπτή μέσω της προσθήκης αναστολέα σακχάρου λακτόζης και τα αιμοπετάλια από διασπασμένα συσσωματώματα διατήρησαν την απόκριση για δημιουργία άλλων συσσωματωμάτων. Η συσσωμάτωση των καθαρισμένων αιμοπεταλίων εξαιτίας της *λεκτίνης*, ήταν πιο ανθεκτική στους μεταβολικούς αναστολείς σε σχέση με την κυτταρική αλληλεπίδραση που εξαρτάται από τη θρομβίνη ή το αραχιδονικό οξύ (Büssing, 1999).

Δύο κλάσματα *λεκτίνης* με σχεδόν την ίδια κυτταροτοξική ενεργότητα πάνω στα κύτταρα MOLT-4 αλλά με διαφορετικές σχέσεις υδρογονανθράκων απομονώθηκαν μέσω χρωματογραφίας συγγένειας από το φάρμακο του ιξού: η *λεκτίνη I* ιξού με μια σχέση με D-γαλακτόζη και GalNAc και *λεκτίνη II* ιξού με μια σχέση με GalNAc. Τα κλάσματα *λεκτίνης* και το φάρμακο του ιξού ανέστειλαν τη σύνθεση πρωτεϊνών των κυττάρων MOLT-4 κατά πολύ περισσότερο από τη σύνθεση DNA (Olsnes, 1982). Οι μερικώς και υψηλά καθαρισμένες *λεκτίνες* από το *Viscum album* προκαλούν μια μείωση της βιωσιμότητας των ανθρώπινων καλλιιεργειών κυττάρων λευχαιμίας που εξαρτάται από τη δόσολογία, MOLT-4, μετά από θεραπεία 72 ωρών. Το LC50 της μερικώς καθαρισμένης *λεκτίνης* ήταν 27,8 ng/ml, της υψηλά καθαρισμένης *λεκτίνης* 1,3 ng/ml. Σε σύγκριση με την υψηλά καθαρισμένη *λεκτίνη* μια 140-πλάσια υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης ενός υδατικού φαρμάκου ιξού απαιτήθηκε για την απόκτηση παρόμοιων κυτταροτοξικών δράσεων πάνω σε κύτταρα MOLT-4. Η κυτταροτοξικότητα της υψηλά καθαρισμένης *λεκτίνης* αναστάλθηκε από D-γαλακτόζη και λακτόζη, ενώ η κυτταροτοξικότητα του φαρμάκου ιξού και της μερικώς καθαρισμένης *λεκτίνης* αναστάλθηκε με λακτόζη και N-ακετυλο-D-γαλακτοσαμίνη (GalNAc) (Olsnes, S, 1982).

Ένα πεπτίδιο που απομονώθηκε από το εκχύλισμα *Viscum album (Iscador)* διέγειρε τους μακροφάγους *in vitro* και *in vivo* και οι ενεργοποιημένοι μακροφάγοι διαπιστώθηκε ότι έχουν κυτταροτοξική δράση κατά της ινοπλάσιας L-929 (Ελβετική Εταιρεία Ογκολογίας, 2001).

Το *Iscador Pini*, ένα εκχύλισμα που προέρχεται από το *Viscum album L.* και το οποίο αναπτύσσεται σε πεύκα και περιέχει ένα αντιγόνο που δεν συνδέεται με λεκτίνη, προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των μονοκυτταρικών κυττάρων περιφερειακού αίματος (Cammarata, 1967).

Οι πολυσακχαρίτες ενδέχεται να παίζουν ρόλο στη φαρμακολογική δράση των εκχυλισμάτων *Viscum album*, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου. Ο κύριος πολυσακχαρίτης των πράσινων μερών του *Viscum* είναι ένα υψηλά εστεροποιημένο γαλακτουρονικό οξύ ενώ το *Viscum* παράγει μια αραβινογαλακτάνη που κυριαρχεί και αλληλεπιδρά με τη λεκτίνη γαλακτόζης (*ML I*) (Stein, 1999).

Σχετικές δράσεις από άλλα είδη: Το κινέζικο βότανο *Viscum alniformosanae* είναι η πηγή ενός εξαρτημένου μέσου (CM), γνωστού ως 572-CMF-, το οποίο είναι σε θέση να διεγείρει τα μονοκύτταρα κύτταρα. Αυτό το CM έχει την ικανότητα να προκαλεί την προμυελοκυτταρική γραμμή HL-60 για να διαφοροποιείται σε μορφολογικά και λειτουργικά ώριμα μονοκυτταροειδή κύτταρα. Από έρευνες έχει προκύψει ότι το 572-CM δεν περιείχε *IFN-r*, *TNF*, *IL-1* και *IL-2* (Chen, 1992).

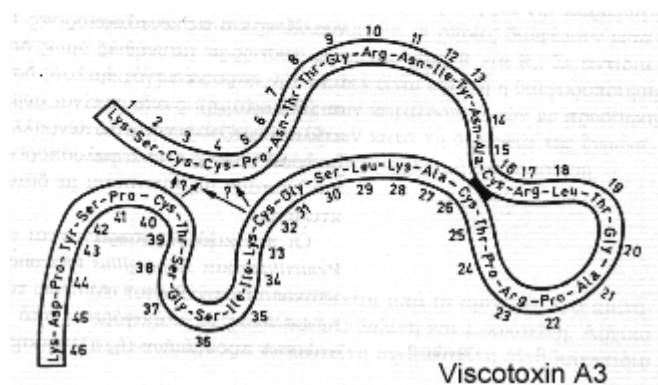
Τα εξανικά εκχυλίσματα του παρασιτικού *Viscum cruciatum Sieber* στο *Crataegus monogyna Jacq.* (I), *Crataegus monogyna Jacq.* παρασιτούσαν με το *Viscum cruciatum Sieber* (II), και *Crataegus monogyna Jacq.* Τα μη παρασιτικά (III), και κλάσματα εμπλουτισμένα με τριτερπένια απομονωμένα από I, II και III (*CFI*, *CFII*, *CFIII* αντιστοίχως) εμφάνισαν μια σημαντική κυτταροτοξική δραστηριότητα κατά καλλιεργημένων κυττάρων καρκίνου του λάρυγγα (HEp-2 κύτταρα), (Gomez, 1997).

1.4. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ VISCUM ALBUM L.

Τα εκχυλίσματα από τον φρέσκο χυμό του φυτού είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, αλκαλοειδή και πολυσακχαρίτες. Το πρωτεϊνικό τμήμα είναι υψηλού μοριακού βάρους, με καλή αντινεοπλασματική δράση. Είναι ιδιαίτερος θερμοευαίσθητο (χάνει τη δράση του ακόμη και με σύντομη θέρμανση στους 40 °C), ενώ είναι ιδιαίτερα τοξικό και κατά συνέπεια το αρχικό εκχύλισμα είναι άχρηστο ως φάρμακο. Το αρχικό αυτό εκχύλισμα παρουσιάζει υποτασική δράση σε πειραματόζωα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, δράση που οφείλεται εν μέρει στην παρουσία σε αυτό χολίνης και γ-αμινοβουτιρικού οξέος κι εν μέρει στις μικρές βασικές πρωτεΐνες, τις βισκοτοζίνες (Samuelsson, 1996). Τα κύρια συστατικά του πρωτεϊνικού τμήματος των εκχυλισμάτων του ιξού είναι οι βισκοτοζίνες, και τρεις λεκτίνες (λεκτίνη λακτόζης, λεκτίνη γαλακτόζης, λεκτίνη N-ακετυλογαλακτοσαμίνης).

Βισκοτοζίνες: Οι βισκοτοζίνες είναι βασικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από μία αλυσίδα 46 αμινοξέων, η οποία περιέχει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες και συνδέονται στενά με την ομάδα των θειονινών. Είναι κοινές σε φυτά όπως το καλαμπόκι, το σιτάρι, και άλλα και θεωρείται ότι προστατεύουν από μολύνσεις ιών, βακτηρίων και μυκήτων (Carrasco, 1981). Οι τρεις κύριες βισκοτοζίνες ονομάζονται βισκοτοζίνες A2, A3 και B, έχουν μοριακό βάρος 5 kD και ισοηλεκτρικό σημείο 9-11 pH. Τα πεπτίδια αυτά εμφανίζουν σημαντικό βαθμό ομολογίας με μικρές μόνο διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων, κι είναι πολύ σταθερά, ακόμη και κάτω από συνθήκες μετουσίωσης. Η δράση των ουσιών αυτών είναι παρόμοια με εκείνη των καρδιοτοξινών, των δηλητηρίων της κόμπρας (προκαλούν εκπόλωση των

κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητά τους από ιόντα), μολονότι δεν έχει προσδιοριστεί κοινή αλληλουχία αμινοξέων (Samuelsson, 1996). Συγκεκριμένα, η βισκοτοξίνη φαίνεται να δρα κυρίως με το να προκαλεί καταστροφές στην κυτταρική μεμβράνη και επαγωγή κυτταρικής νέκρωσης και όχι μέσω της τροποποίησης της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος (Ring, 2001).



Εικόνα 1 : Απεικόνιση του μορίου της βισκοτοξίνης (Samuelsson, 1996).

Λεκτίνες: Γενικά, ως *λεκτίνη* ορίζεται μια πρωτεΐνη η οποία δεν είναι αντίσωμα ή ένζυμο (Franz, 1990), αλλά έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε ειδικά σάκχαρα. Η σύζευξη αυτή δεν είναι ομοιοπολικής φύσεως και το σάκχαρο είναι είτε ελεύθερο ή αποτελεί τμήμα μεγαλύτερου μορίου το οποίο είναι παρόν π.χ. σε μια μεμβράνη. Οι *λεκτίνες* βρίσκονται στα φυτά, σε μικροοργανισμούς, σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς και στα θηλαστικά. Οι *λεκτίνες* στα φυτά βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα, ενώ ιδιαιτέρως πλούσια σε *λεκτίνες* είναι τα σπέρματα φυτών που ανήκουν στην οικογένεια *Fabaceae* (Samuelsson, 1996). Η παρουσία των *λεκτινών* στους μικροοργανισμούς διευκολύνει την προσκόλλησή τους σε άλλα κύτταρα με αποτέλεσμα οι μολύνσεις από παθογόνα βακτήρια να πραγματοποιούνται μέσω αυτών. Οι *λεκτίνες* φαίνεται ότι εμπλέκονται και στην δημιουργία καρκινικών μεταστάσεων, αφού καθιστούν ικανά τα καρκινικά κύτταρα να προσκολλώνται στο νέο όργανο στόχο (Samuelsson, 1996).

Οι φυτικές *λεκτίνες* παίζουν σημαντικό ρόλο στις επιστήμες που ασχολούνται με την διατροφή και την υγεία. Πολλές φυτικές *λεκτίνες* έχουν την ικανότητα να προκαλούν συγκόλληση των ερυθροκυττάρων ως εξής: η *λεκτίνη* δεσμεύεται σε ειδικούς υδατάνθρακες επί της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, ενώ ένα μόριο αυτής είναι σε θέση να δεσμεύσει περισσότερα του ενός ερυθροκύτταρα με αποτέλεσμα να σχηματιστούν συσσωματώματα τα οποία καθιζάνουν. Ορισμένες *λεκτίνες* δεν εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση και προκαλούν συγκόλληση των ερυθροκυττάρων όλων των ομάδων αίματος, ενώ άλλες εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση. Οι *λεκτίνες* αυτές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά στη διάγνωση των ομάδων αίματος σε επίπεδο μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων. Ορισμένες *λεκτίνες*, όπως η *κονκαναβαλίνη Α*, η οποία προέρχεται από το μπιζέλι *Canavalia ensiformis (L.) DC.*, διεγείρουν τη μίτωση των κυττάρων. Επίσης, λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν εκλεκτικά ορισμένα σάκχαρα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη χρωματογραφία συγγενείας ενώσεων οι οποίες περιέχουν ειδικά σάκχαρα και στον ιστοχημικό προσδιορισμό ενώσεων σε ιστούς (Samuelsson, 1996). Μεταξύ του μεγάλου αριθμού των φυτικών *λεκτινών*, διακρίνεται ένας αριθμός *λεκτινών* από μη σχετικά είδη που ανήκουν στην αποκαλούμενη ομάδα RIP (Ribosome Inactivating Proteins). Η πιο γνωστή *λεκτίνη* αυτής της ομάδας είναι η *ρικίνη (ricin)*, η οποία παράγεται από το είδος *Ricinus communis L. (Euphorbiaceae)*, τα σπέρματα του οποίου αποτελούν την πηγή του ελαίου κίεως (καστορέλαιο) και έχει αναγνωριστεί ως πολύ τοξική και αιμοσυγκολλητική, πάνω από εκατό χρόνια. Οι πρωτεΐνες αυτής της ομάδας χωρίζονται σε δύο ομάδες, την τύπου 1 RIP (μονής αλυσίδας πρωτεΐνες, που δε δεσμεύονται σε σάκχαρα) και την τύπου 2 RIP (διπλής αλυσίδας πρωτεΐνες). Παρ' όλο που πάνω από 30 είδη ουσιών έχουν περιγραφεί στο 1 RIP, λίγα μόνο είδη ουσιών ανήκουν στην 2 RIP, γι' αυτό κι η περιγραφή των *λεκτινών* του ιξού κατά τα τέλη της δεκαετίας του '70, που έμοιαζε μοριακά με αυτήν της *ρικίνης*, ήταν μεγάλη έκπληξη (Pfüller, 2000).

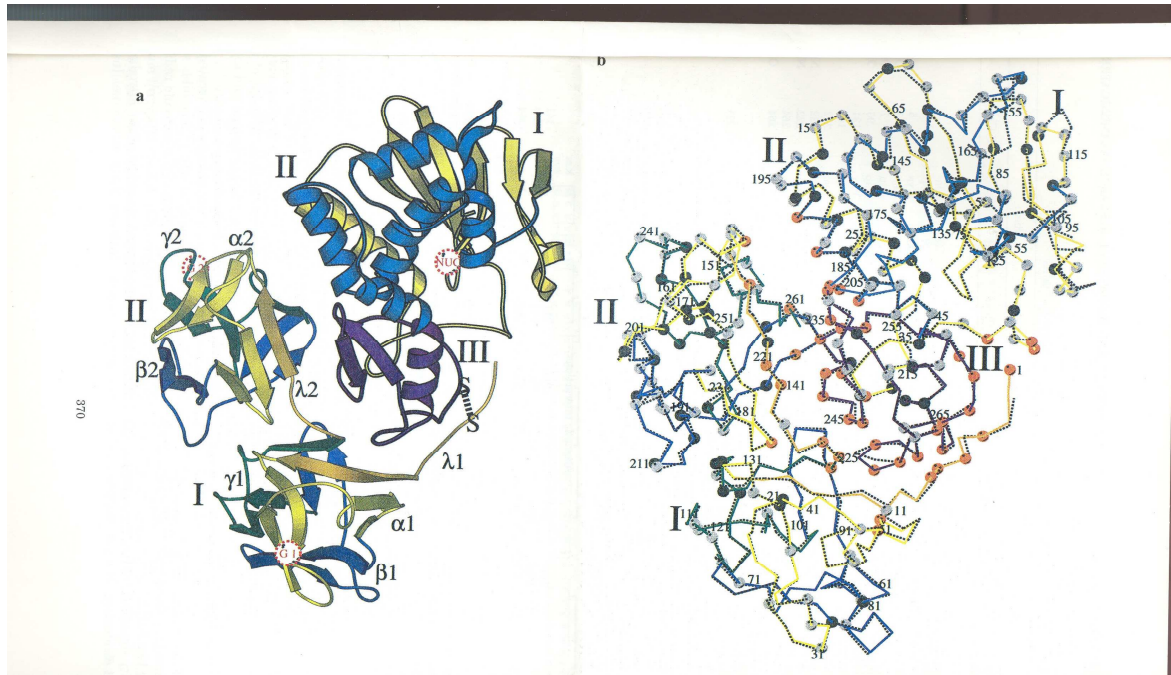
Το ευρωπαϊκό είδος ιξού ανήκει στις λίγες οικογένειες φυτών που περιέχουν πάνω από ένα είδος *λεκτίνης*, τις *γαλακτο/γαλακτοNAc-* αναγνωρίσιμες *ML-I*, *ML-II*, *ML-III* που ανήκουν στον 2 RIP τύπο και μία *λεκτίνη* με βασική δομή, τη *γλουκοNAc-*ολιγομερή συνδεόμενη *λεκτίνη VisalbcBL*.

Οι *λεκτίνες* που περιέχονται στο εκχύλισμα του ιξού είναι τοξικές. Έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί τρεις ενώσεις με τις ονομασίες *λεκτίνη I* ή *ML-I* (*Viscum – Lectin, Mistellektin I, Viscumin*, ή *VAL*) μοριακού βάρους 115.000 Dalton, *λεκτίνη II* ή *ML-II* (*Viscumtoxin, Mistellektin II*) μοριακού βάρους 60.000 Dalton και *λεκτίνη III* ή *ML-III* μοριακού βάρους 50.000 Dalton. Είναι και οι τρεις ενώσεις γλυκοπρωτεΐνες. Αποτελούνται από δύο πρωτεϊνικές αλυσίδες –Α και –Β, οι οποίες συνδέονται μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Στην *ML-I* πρωτεΐνη τα μοριακά βάρη των υπομονάδων είναι 29.000 Da (Α) και 34.000 Da (Β), ενώ στην *VAA II* είναι 27.000 Da (Α) και 32.000 Da (Β) και στην *ML-III* 30.000 Da (Α) και 25.000 Da (Β) αντίστοιχα (Franz, 1986). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό και την παραπάνω κατάταξη των *λεκτινών* ιξού από τον Franz (1986) ήταν χρωματογραφία συγγενείας και υδρολυμένη Sepharoze ή λακτόζης Sepharoze. Η *λεκτίνη I* δεσμεύει εκλεκτικά την *D-γαλακτόζη*, η *λεκτίνη II* την *D-γαλακτόζη/N-ακετυλ-γαλακτοζαμίνη* και η *λεκτίνη III* την *N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη*. Οι Samtleben και Kiefer χρησιμοποιώντας οξική Sepharoze απομόνωσαν δύο *λεκτίνες* που τις ονόμασαν *V. Album agglutinin I (VAA I)* και *V. Album agglutinin II (VAA II)* (Samtleben, 1985). Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι *ML-I* και *VAA I* είναι ταυτόσημες (Franz, 1986).

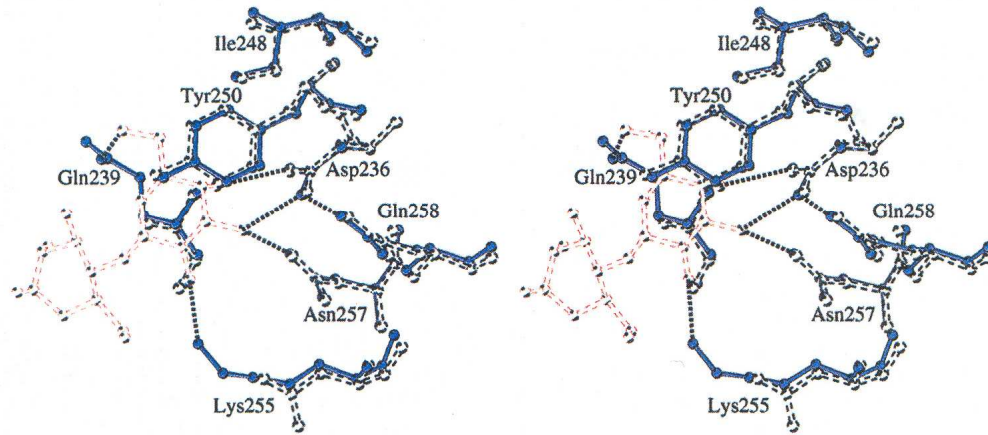
Οι συγκεκριμένες *λεκτίνες* δεσμεύουν εκλεκτικά γαλακτόζη και γαλακτοζαμίνες και προκαλούν συγκόλληση των ερυθροκυττάρων του ανθρώπου, κατά ένα μη εξειδικευμένο τρόπο (Samuelsson, 1996). Επίσης οι δράσεις της *βισκουμίνης (ML-I)* συμπεριλαμβάνουν την παρεμβολή στη σύνθεση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, τη διέγερση της παραγωγής κυτοκινών και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων. Ακόμη, ενδέχεται να επηρεάζει τη διαδικασία των μεταστάσεων και της κυτταρικής απόπτωσης (Ring, 2001).

Το 1996 η ομάδα του Peumans στο Katholieke Universiteit Leuven, του Βελγίου απομόνωσε μία νέα *λεκτίνη* από το εκχύλισμα του ιξού την οποία ονόμασε *VisalbCBL*. Αυτή διαφέρει τελείως από τις τρεις άλλες *λεκτίνες* του ιξού (*ML-I*, *ML-II*, *ML-III*). Βιοχημικές αναλύσεις επιβεβαιώνουν ότι η νέα αυτή *λεκτίνη* αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 10.8 kDa. Η *VisalbCBL* παρουσιάζει εκλεκτικότητα σε ολιγομερή της *N-ακετυλογλουκοζαμίνης* και δείχνει ομολογιακή αλληλουχία στις προηγούμενες απομονωμένες χιτινο-δεσμευόμενες φυτικές πρωτεΐνες. Παρ' όλο που η *λεκτίνη* αυτή είναι λιγότερο τοξική από τις άλλες πρωτεΐνες του ιξού, παρουσιάζει κυτοτοξικές ιδιότητες. Η πιθανή εμπλοκή της στις βιολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες του ιξού είναι υπό διερεύνηση (Peumans et al, 1996). Ο Van Damme, το 1998, πρότεινε ότι αυτή η *λεκτίνη* είναι πιθανόν μέρος της άμυνας του φυτικού συστήματος εναντίον των βακτηρίων, των μυκήτων και των εντόμων, βασιζόμενος στην παρόμοια δράση άλλων *λεκτινών* που ανήκουν στην κατηγορία των χιτινο-δεσμευόμενων πρωτεϊνών (Van Damme, 1998 a,b).

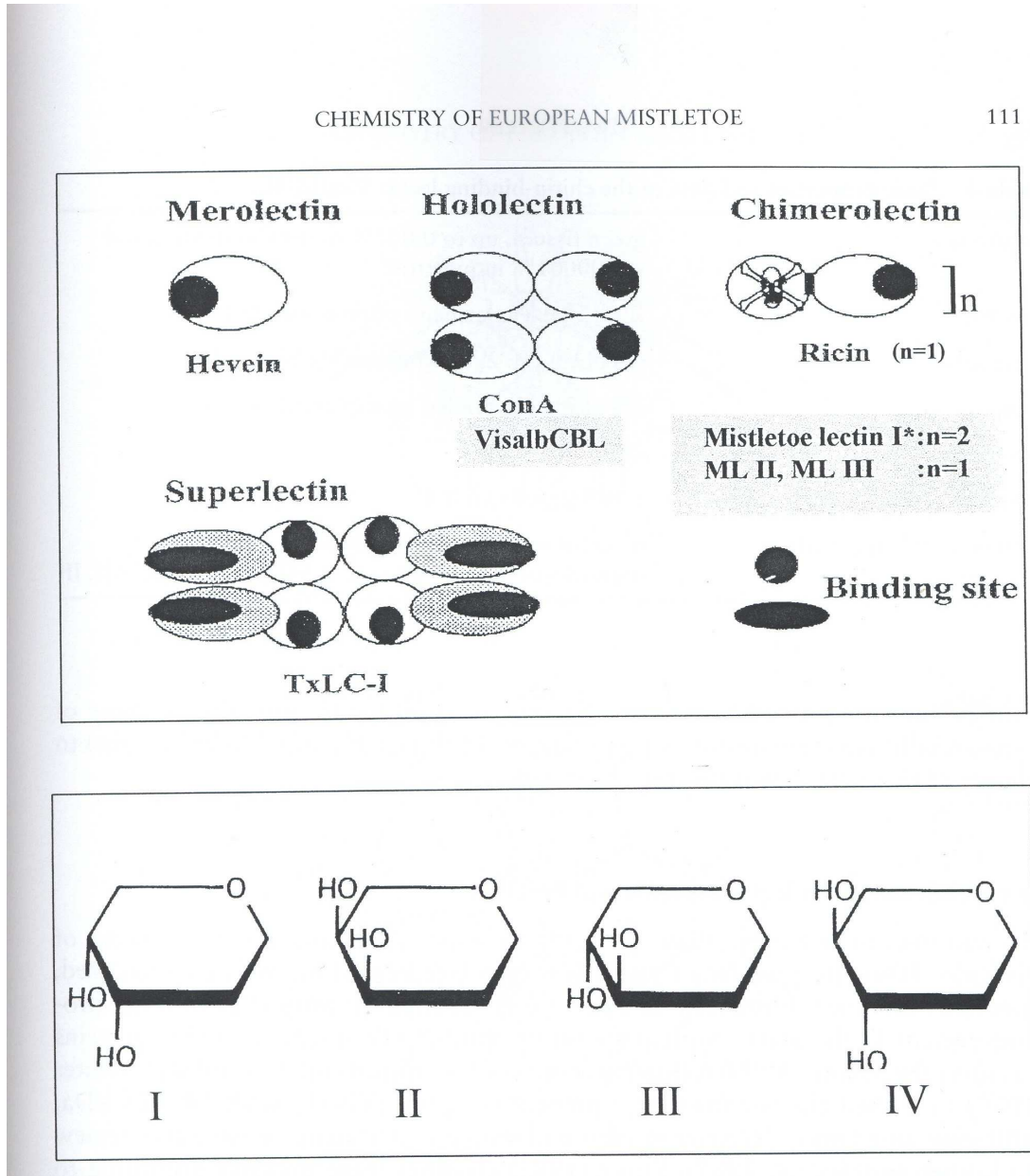
Οι αιμοσυγκολλητικές δράσεις των *λεκτινών* του ιξού περιγράφησαν πρώτα από τον Krüpe (1956) και τον Bird (1954). Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1973 οι Luther et al κατάφεραν ν' απομονώσουν μία *λεκτίνη* ιξού, ενώ το 1981 οι Franz et al απομόνωσαν και χαρακτήρισαν τις τρεις βασικές *λεκτίνες* του ιξού (*ML-I*, *ML-II*, *ML-III*). Και για τις τέσσερις γνωστές, έως σήμερα, *λεκτίνες* του ιξού, η εποχή της συλλογής για την παρασκευή του εκχυλίσματος και το είδος του ξενιστή του ιξού παίζουν ρόλο τόσο στην ποσότητα όσο και στο είδος της παραγόμενης *λεκτίνης* (Pfüller, 2000), ενώ έχει παρατηρηθεί ότι ο ξενιστής και η δριμύτητα του ψύχους παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση των δύο αλυσίδων (A, B) της *ML-I*. Ο ιξός, για παράδειγμα, που μεγαλώνει σε πεύκα περιέχει κυρίως *ML-III* και πολύ μικρή ποσότητα *ML-I*, ενώ σε φυλλοβόλα δέντρα περιέχει κυρίως *ML-I* και *ML-II* (Eifler, 1993). Όσον αφορά την εποχικότητα οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σε *λεκτίνες* παρατηρούνται την περίοδο του χειμώνα, ενώ οι χαμηλότερες την περίοδο του καλοκαιριού (Pfüller, 2000).



Εικόνα 2 : (α) Σχεδιάγραμμα της βασικής δομής του *ML-I*. Οι τρεις περιοχές στην Α αλυσίδα έχουν μαρκαριστεί σαν *I*, *II*, *III* και έχουν χρωματιστεί κίτρινη, τυρκουάζ και μωβ, αντίστοιχα. Για τη Β αλυσίδα οι περιοχές *I* και *II* είναι χρωματισμένες με βάση τις υποπεριοχές τους: οι διασυνδεδεμένες περιοχές $\lambda 1$ και $\lambda 2$ είναι χρωματισμένες πορτοκαλί, οι ομόλογες υποπεριοχές α , β , και γ είναι κίτρινες, μπλε και πράσινες αντίστοιχα. Ο δισουλφιδικός δεσμός που συνδέει τις δύο αλυσίδες, είναι η έντονη χρωματισμένη μπλε διακεκομμένη γραμμή που έχει μαρκαριστεί. Οι διακεκομμένοι κύκλοι υποδεικνύουν τις περιοχές ένωσης των νουκλεοτιδίων (NUK) για την Α αλυσίδα, τα χαμηλής (G1) και υψηλής έλξης (G2) σημεία ένωσης της γαλακτόζης στην αλυσίδα Β. (β) Εναποθέσεις Ασβεστίου του *ML-I* (έντονη γραμμή με χρώματα κωδικοποιημένα όπως στο (α).) και ρικίνη (μαύρη διακεκομμένη γραμμή). Κάθε δέκατο υπόλοιπο μαρκάρεται ξεκινώντας από το 5 στην αλυσίδα Α και από το 1 στην αλυσίδα Β. Οι θέσεις των υποκαταστατών υποδεικνύονται με χρωματιστές σφαίρες. Οι κόκκινες δείχνουν υποκαταστάτες στα σημεία αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλυσίδων, οι ανοιχτές γκρι σφαίρες οριοθετούν υποκαταστάτες σε επιφανειακές περιοχές, οι σκούρες γκρι εσωτερικούς υποκαταστάτες (Büssing, 2000).



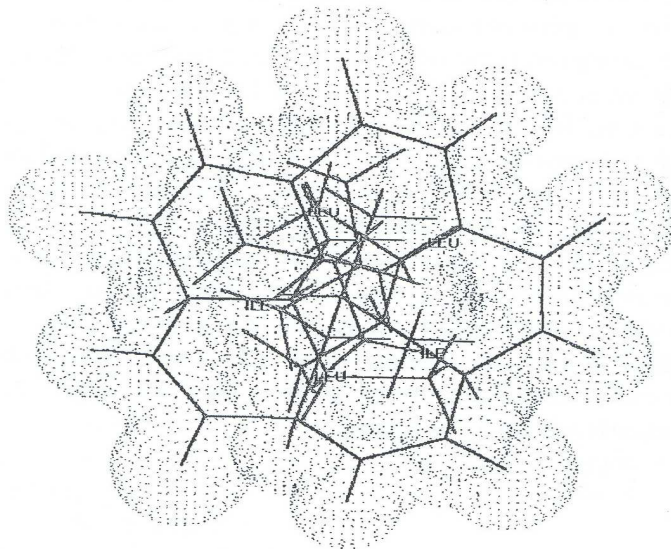
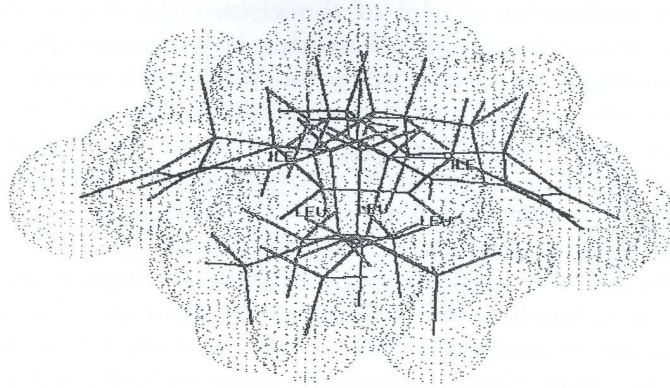
Εικόνα 3 : Σύγκριση της περιοχής σύνδεσης υψηλής έλξης της *γαλακτόζης* της *ML-I* (μπλε σφαίρες και γραμμές) και της *ρικίνης* (διακεκομμένη γραμμή), η θέση των ενώσεων των μορίων σακχάρων υποδεικνύεται από τις κόκκινα διακεκομμένα περιγράμματα των σφαιρών και των γραμμών. Οι δεσμοί υδρογόνου προδιορίζονται από τις μαύρες διακεκομμένες γραμμές (Büssing, 2000).



Εικόνα 4 : Δομική κατηγοριοποίηση των λεκτινών (σύμφωνα με τους Peumans et al, 1998) και οι θέσεις των τεσσάρων λεκτινών του ιξού *ML-I*, *ML-II*, *ML-III* και η διμερής *visalbCBL* (φαίνονται στο επάνω κουτί). Το κάτω κουτί εμφανίζει την δυνατότητα κατηγοριοποίησης των πρωτεϊνών μέσω των πρωτογενών μονοσακχαριτών. Η κατηγορία *I* περιλαμβάνει αυτές που αναγνωρίζουν την φουκόζη, η *II* αυτές που αναγνωρίζουν την γαλακτόζη/galNAc (όπως η *ML*, η ρικίνη, η γιακαλίνη, οι γαλεκτίνες), και η *III* αυτές που ενώνονται με την γλυκόζη / μανόζη glucNAc (όπως η *κονκαναβαλίνη A* και η *visalbCBL*). Η κατηγορία *IV* δεν έχει προς το παρόν συμπληρωθεί. * Η *ML-I* σχηματίζει στις περισσότερες περιπτώσεις ένα διμερές (Büssing, 2000).

Άλλες πρωτεΐνες: Οι *ML* λεκτίνες του ιξού αποτελούν μόνο το 2% της συνολικής ποσότητας πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών που παράγονται από το

εκχύλισμα του ιξού. Παράλληλα τα πεπτίδια των *βισκοτοζινών* έχουν προσδιοριστεί και χαρακτηριστεί, αλλά ένα μεγάλο μέρος των υπόλοιπων πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτό το εκχύλισμα μένει απροσδιόριστο. Στην προσπάθεια να περιγραφούν και απομονωθούν αυτές οι πρωτεΐνες, ο Vester το 1977 παρουσίασε ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών (Vester Proteins (VP)-16) με μοριακά βάρη 14-125 kDa, το οποίο παρουσίασε ισχυρή αντικαρκινική δράση *in vivo* και ισχυρή κυτταροτοξική δράση *in vitro* (Luther, 1987). Αργότερα, ο Kuttan κι οι συνεργάτες του, απομόνωσαν ένα κλάσμα πολυπεπτιδίων με ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες, το οποίο επίσης πρέπει να χαρακτηριστεί (Pfüller, 2000). Από το κορεατικό είδος του ιξού έχει απομονωθεί ένα κυκλικό πεντα-πεπτίδιο, το οποίο ονομάστηκε *βισκουμαμίδη* (*viscumamide*) και το οποίο δεν έχει ακόμη περιγραφεί για το ευρωπαϊκό είδος, ούτε έχει αναφερθεί κάποια βιολογική του δράση (Pfüller, 2000).

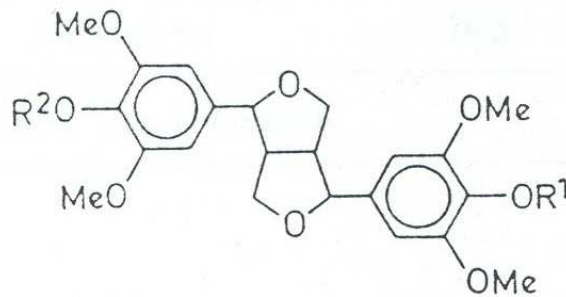
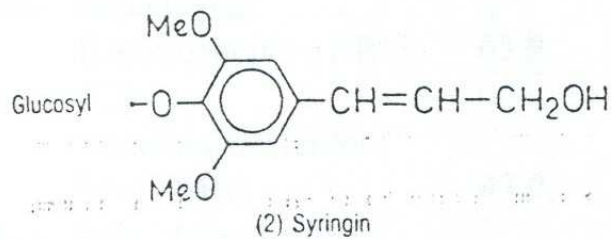
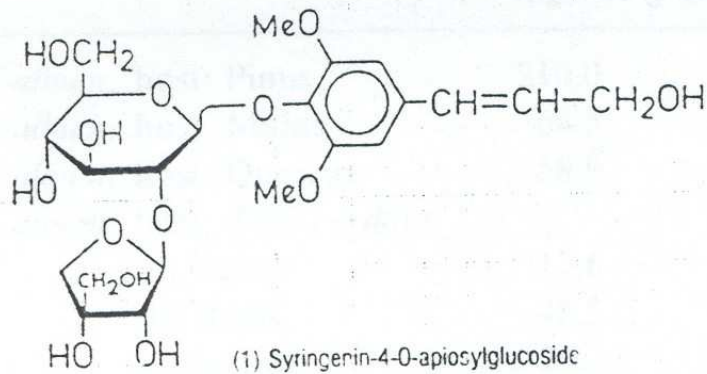


Εικόνα 5 : Μοριακά μοντέλα της *Βισκουμαμίνης* (πλαϊνή όψη και κάτοψη), (Büssing, 2000).

Αλκαλοειδή: Τα συστατικά τύπου αλκαλοειδών που αναφέρονται για τον ευρωπαϊκό ιξό, περιλαμβάνουν ουσίες όπως η *τυραμίνη*, *φαινυλεθυλαμίνη*, *χολίνη* και *ακετυλοχολίνη* (Hegenauer, 1996). Σε αντίθεση με το *Viscum album var. Coloratum*, το *Viscum album L.* (ευρωπαϊκό είδος) δεν περιέχει τυπικά αλκαλοειδή. Το 1986 περιγράφησαν τα προερχόμενα αλκαλοειδή και από τα δύο είδη ιξού. Ο προσδιορισμός τους έγινε από το εκχύλισμα του ιξού, αλλά λόγω της μεγάλης τους αστάθειας δεν έγινε δυνατός ο χαρακτηρισμός τους (Pfüller, 2000).

Φλαβονοειδή: Η πρώτη αναφορά για τα φλαβονοειδή του ιξού έγινε το 1955 από τον Schindler, ενώ το 1978, 1980 και 1987 έγιναν λεπτομερέστερες αναφορές από τους Becker, Exner και Fukunaga. Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από τον ιξό είναι οι: α) *2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-glycoside*, β) *2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone-4-O-glycoside*, γ) *2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone-4-O-[apriosyl-(1->2)]glycoside*, δ) *(2R)-5,7-Dimethoxyflavonone-4'-O-glucoside*, ε) *(2S)-3',5,7-Trimethoxyflavonone-4'-O-glucoside*, στ) *(2S)-Homoeriodictyol-7-O-glycoside* και ζ) *Rhamnazin-3,4'-di-O-glucoside* (Pfüller, 2000). Από τον ιξό που προέρχεται από το έλατο, απομονώθηκαν τα εξής φλαβονοειδή: *aglyca homoeriodictyol*, *sakuranetin*, *rhamnazin*, *isorhamnetin* και άλλα έξι *quercetin methylethers*, ενώ από τον ιξό που προέρχεται από το πεύκο: *5-quercetin methylester*, *5,7-Dimethoxy-4'-hydroxyflavon* και *sakuranetin*. Ακόμη διάφορα άλλα φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί και από το κορεατικό ιξό, όπως *flavoyandrinin-A*, *flavoyandrinin-B*, *homo-flavoyandrinin-B* (Pfüller, 2000).

Φαινυλοπροπανόλες: Είναι σχετικές ουσίες με τα φλαβονοειδή, αφού ακολουθούν τα ίδια βιογενετικά μονοπάτια. Οι πιο γνωστές ουσίες της κατηγορίας αυτής είναι τα παράγωγα του *κινναμωμικού οξέος*, όπως είναι το *καφεϊκό οξύ*, *σιναπικό οξύ* και *φερουλικό οξύ*, τα οποία περιέχονται στον ευρωπαϊκό ιξό, μαζί με τα μεταβολικά αποδομημένα παράγωγά τους, όπως *πρωτοκατεχικό οξύ*, *συριγγικό οξύ*, *βανιλικό οξύ* *ανισικό οξύ* και *γεντισικό οξύ* (Pfüller, 2000).



(3) Eleutherioside F

: $R^1 = R^2 = \text{Glucosyl}$

(4) Syringaresinolmono-O-glucoside

: $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Glucosyl}$

Syringaresinol

: $R^1 = R^2 = \text{H}$

Εικόνα 6 : Φαινολικά παράγωγα του ιξού (Büssing, 2000).

Υδατάνθρακες: Λόγω των πολλαπλών ικανοτήτων τους να αλληλεπιδρούν με διάφορα φυτικά συστατικά, επηρεάζοντας την διαλυτότητά τους, τη σταθερότητά τους, ακόμα και τη βιολογική τους συμπεριφορά, μέσα από πολυσύνθετες αλληλοεπιδρώμενες διαδικασίες, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη δράση των υδατανθράκων ως βιολογικά ενεργά συστατικά. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν στα εκχυλίσματα από φύλλα και βλαστούς του ιξού ότι περιέχονται κυρίως μεθυλεστέρες του 1→4 γαλακτουρονικού οξέος, ενώ στους καρπούς ραμνογαλακτουρονάνες, ως

βασικές δομές των οποίων ανεξάρτητοι κλάδοι (1→β6)-D-galactan αλυσίδες δεσμεύονται μέσω του O-4 υπολοίπου της ραμνόσης και τα υπόλοιπα των αραμπινοσουλ- ή τα συμπλέγματα αλυσίδων αραμπιναν- συνδέονται μέσω των O-3 ομάδων της γαλακτόζης. Στα φύλλα και βλαστούς εντοπίστηκαν, επίσης, μία πεκτίνη με μοριακό βάρος 42 kDa και μικρές ποσότητες μίας αραβινογαλακτάσης 110 kDa. Στους καρπούς εντοπίστηκε, ακόμη, μία υψηλού μοριακού βάρους ραμνογαλακτουρονάνη (700 kDa) με πλευρικές αλυσίδες αραβινογαλακτάνης (Pfüller, 2000). Μόλις το 1999 απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πολυσακχαρίτες από τους καρπούς του ιξού. Οι όξινοι (1,340 kDa) και οι ουδέτεροι (30 kDa) ολιγο- και πολυσακχαρίτες αποτελούνται από έναν άξονα ραμινοσο-γαλακτουρονικού οξέος με πολλούς κλάδους πλευρικών αλυσίδων αραβινο-γαλακτόζης (όξινοι ολιγοσακχαρίτες) και αραβινογαλακτάνες με μικρές ποσότητες ζυλογλουκανών (ουδέτεροι πολυσακχαρίτες). Τα πρώτα αποτελέσματα από μελέτες με πολυσακχαρίτες του ιξού έδειξαν ότι επάγουν τα κύτταρα IL-6 και IFN-γ και των πολλαπλασιασμό των CD4⁺ T βοηθητικών κυττάρων. Ταυτόχρονη προσθήκη των *ML-I* ή *ML-III* με πολυσακχαρίτες μπορεί ν' αυξήσει την πρόσληψη του θυμιδικού-αναλόγου BrdU στο DNA των κυττάρων, συγκρινόμενο με τους πολυσακχαρίτες ή τις λεκτίνες μεμονωμένα. Όμως αυτές οι αντιδράσεις έδειξαν έντονες διαφορές, αφού μερικά άτομα ανταποκρίθηκαν με αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ άλλα έδειξαν καταστολή των παραγόμενων πολυσακχαριτών BrdU, λαμβανομένων από τις λεκτίνες *ML* και κάποια άλλα άτομα δεν ανταποκρίθηκαν καθόλου. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί ν' αντιδρά ξεχωριστά σε ατομικό επίπεδο στα ερεθίσματα (Pfüller, 2000). Αν και ακόμη δεν είναι πλήρως κατανοητό, αρκετά από τα συστατικά του ιξού μπορούν ν' αλληλεπιδράσουν στην ισχύ των βιολογικών ιδιοτήτων του φαρμάκου, γι' αυτό χρειάζεται περισσότερη έρευνα.

Άλλες ουσίες: Στα εκχυλίσματα του ευρωπαϊκού ιξού έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί οι β-σιτοστερόλη και σιγμαστερόλη, γνωστές φυτοστερόλες, φυτοστεροειδή καθώς και οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες τους. Επίσης, τα εκχυλίσματα αυτά είναι πλούσια σε τριτερπενοειδή, όπως β-αμυρίνη, β-οζική-αμυρίνη, βετουλινικό οξύ, ολεανικό οξύ και ουρσολικό οξύ. (*oleanolic ursolic betulinic amyrin-acetate*). Το 1992 ο Richter απομόνωσε από εκχυλίσματα του ιξού την *ID-1-O-μεθυλ-μουκο-ινοσιτόλη*, παράγωγο της *O-μεθυλ-ινοσιτόλης*, η οποία σπάνια συναντάται σε ανώτερα φυτά. Η ουσία ανήκει στις πολυαλκοόλες και συγκεκριμένα στις κυκλιτόλες. Παρατηρήθηκε ότι κατά την περίοδο του χειμώνα οι ποσότητες αυτής της ουσίας αυξάνονται κι έτσι θεωρήθηκε ότι παίζει ρόλο προστατευτικό απέναντι στο ψύχος. Συγκεκριμένα μετρήθηκε σε φύλλα του *Crataegus monogyna* η συγκέντρωσή της επί του ξηρού βάρους, τον Μάρτιο και βρέθηκε ότι είναι 7%, ενώ τον Ιούλιο 4%. Πολλά παράγωγα της *ινοσιτόλης* που περιλαμβάνουν *ID-1-O-μεθυλ εστέρες* επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των *ML* λεκτινών με τις ενώσεις της γαλακτόζης. Άλλες σακχαρικές αλκοόλες που παρατηρούνται στο εκχύλισμα είναι η *μαννιτόλη*, η *κουμπακιτόλη*, η *πινιτόλη* και η *βισκουμιτόλη* (Pfüller, 2000).

1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.5.1. Επίπτωση και αιτίες

Ο καρκίνος αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα υγείας παγκοσμίως, με σταθερά αυξητικές τάσεις. Στις ανεπτυγμένες χώρες θεωρείται η δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Παγκόσμια, έξι εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν από καρκίνο κάθε χρόνο, ενώ μόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 1996 πέθαναν 925.146 ασθενείς (Nikolaou, 2003). Περίπου κάθε τέταρτος πολίτης μιας αναπτυγμένης χώρας θα νοσήσει κατά τη διάρκεια της ζωής του, ενώ υπολογίζεται ότι περίπου 400 νέα περιστατικά προκύπτουν ανά 100.000 ανθρώπους ετησίως (Trichopoulos, 1996). Στις περισσότερες περιπτώσεις η θεραπεία θα προκαλέσει μόνο υποχώρηση της νόσου κι η θνησιμότητα είναι μεγάλη, ενώ ο ανθρώπινος πόνος θεωρείται ως ο βασικότερη και χειρότερη συνέπεια της νόσου, μαζί με το τεράστιο οικονομικό κόστος που απαιτείται για τη θεραπεία (Nikolaou, 2003, Harvey, 1994). Επομένως, κάθε βήμα για την θεραπεία και την ανακούφιση από την νόσο παίζει σημαντικό ρόλο.

Η έρευνα για τον καρκίνο έχει αποκαλύψει στους ερευνητές πολλά σημαντικά στοιχεία (Trichopoulos, 1996). Η ανάπτυξη της ασθένειας αρχίζει από μια γενετική αλλαγή (μετάλλαξη) ενός κυττάρου μέσα σε έναν ιστό. Αυτή η μετάλλαξη επιτρέπει στο κύτταρο να πολλαπλασιαστεί σε έναν πολύ υψηλό ποσοστό και να διαμορφώσει τελικά μια ομάδα γρήγορα αναπαραγόμενων κυττάρων με μια ειδήλως κανονική εμφάνιση (υπερπλασία). Σπάνια, μερικά από αυτά τα κύτταρα θα μεταλλαχθούν πάλι και θα παραγάγουν ανώμαλους εμφανισιακά απογόνους (δυσπλασία). Οι περαιτέρω μεταλλάξεις αυτών των κυττάρων θα οδηγήσουν τελικά σε σχηματισμό ενός όγκου, που μπορεί να παραμείνει εντοπισμένος στη θέση προέλευσής του, ή να εισβάλει σε γειτονικούς ιστούς (κακοήθης όγκος) και να καθιερώσει νέους όγκους (μεταστάσεις). Τα κύτταρα του καρκίνου έχουν μερικές μοναδικές ιδιότητες που τα βοηθούν να ανταγωνιστούν επιτυχώς τα φυσιολογικά κύτταρα:

1. Υπό τους κατάλληλους όρους τα κύτταρα καρκίνου είναι σε θέση να διαιρούνται σχεδόν απείρως, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν μια περιορισμένη διάρκεια ζωής. Για παράδειγμα, τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro* είναι συνήθως ικανά να υποδιαιρούνται για λιγότερο από 50 φορές (ο αποκαλούμενος αριθμός *Hayflick*) (Hayflick και Hayflick, 1961).

2. Τα φυσιολογικά κύτταρα εμμένουν το ένα στο άλλο και στην εξωκυτταρική μήτρα το αδιάλυτο πρωτεϊνικό πλέγμα γεμίζει το διάστημα μεταξύ των κυττάρων. Τα κύτταρα του καρκίνου αποτυγχάνουν να εμμείνουν και, επιπλέον, κατέχουν τη δυνατότητα να μεταναστεύουν από την περιοχή όπου άρχισαν, εισβάλλοντας στους κοντινούς ιστούς και διαμορφώνοντας μάζες σε απόμακρα σημεία στο σώμα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως μετάσταση και τα παραδείγματα περιλαμβάνουν τα κύτταρα μελανώματος που μεταναστεύουν στον πνεύμονα, τα κύτταρα του καρκίνου του εντέρου στο συκώτι και τα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη στα οστά. Αν και τα μεταστατικά κύτταρα είναι πράγματι ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των κυττάρων καρκίνου (π.χ. 10^{-4} ή 0.0001%), όγκοι αποτελούμενοι από τέτοια κακοήθη κύτταρα γίνονται όλο και περισσότερο επιθετικοί κατά τη διάρκεια του χρόνου.

Πιθανοί παράγοντες για την έναρξη και διάδοση της νόσου, αποτελούν τόσο οι εξωτερικοί παράγοντες, όπως χημικά, ακτινοβολίες, ιοί όσο και οι εσωτερικοί παράγοντες όπως ορμόνες, ανοσολογικές καταστάσεις, κληρονομικά γονίδια ή και οι δύο σε συνέργια (Nikolaou, 2003). Αναλυτικότερα, ο καρκίνος προκύπτει λόγω των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων των περιβαλλοντικών παραγόντων (όπως κάπνισμα ή

διατροφή) σε ένα ορισμένο γενετικό υπόβαθρο. Στους ορμονικά εξαρτώμενους καρκίνους όπως του στήθους και του προστάτη, η γενετική φαίνεται να είναι ισχυρότερος παράγοντας από τον τρόπο ζωής. Δύο κατηγορίες γονιδίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο να προκαλέσουν τον καρκίνο: τα πρωτοπαθή ογκογενετικά (proto-oncogenes) γονίδια που ενθαρρύνουν τέτοια αύξηση και τα κατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor) όγκων που την εμποδίζουν. Η συντονισμένη δράση αυτών των δύο κατηγοριών γονιδίων αποτρέπουν κανονικά τα κύτταρα από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό εντούτοις, όταν υπάρχει βλάβη αλλοιώνεται η δράση αυτή και ογκογενετικά προωθείται η υπερβολική κυτταροδιαίρεση, ενώ τα αδρανοποιημένα γονίδια παρεμποδιστών όγκων αποτυγχάνουν να εμποδίσουν τον μηχανισμό διαίρεσης. Σε μοριακό επίπεδο, ο έλεγχος της κυτταροδιαίρεσης διατηρείται με την ανασταλτική δράση των διαφόρων μορίων, όπως pRB, p15, p16, p21 και p53 στις πρωτεΐνες προάγοντας την κυτταροδιαίρεση, ουσιαστικά το σύμπλεγμα μεταξύ των κυκλικών και των κυκλοεξαρτώμενων κινάσεων (CDKs) (Meijer, 1997). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, άρση των ελέγχων του μηχανισμού ελέγχου των κυττάρων, οδηγεί στην κυτταρική αυτοκτονία, τον αποκαλούμενο αποπτωτικό ή προγραμματισμένο θάνατο κυττάρων. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί επίσης να προκύψει από το βαθμιαίο περιορισμό των τελομερών, που είναι τα τμήματα DNA στις άκρες των χρωμοσωμάτων. Εντούτοις, τα περισσότερα κύτταρα όγκων κατορθώνουν να διατηρήσουν τα τελομερή τους, λόγω της παρουσίας της ενζυμικής τελομεράσης, η οποία απουσιάζει στα φυσιολογικά κύτταρα.

Μερικά κύτταρα, σε επίπεδο όγκου, πιέζουν για την υπερπαραγωγή παραγόντων αύξησης, όπως οι αιμοπετάλιο-παραγόμενοι ρυθμιστές αύξησης και ο μετασχηματιζόμενος παράγοντας αύξησης άλφα (όπως συμβαίνει στα σαρκώματα και γλοιώματα). Εναλλακτικά, ογκογονίδια όπως τα *ras* γονίδια διαστρεβλώνουν κλιμακωτά το σήμα μέσα στο κύτταρο (καρκίνωμα του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του πνεύμονα) ή αλλάζουν τη δραστηριότητα των παραγόντων μεταγραφής στον πυρήνα. Επιπλέον, οι παράγοντες παρεμποδιστών μπορούν να τεθούν εκτός λειτουργίας επάνω στη μόλυνση με τους ιούς (π.χ. ένα ανθρώπινο παπिलομαϊό-θηλωματοϊό). Η ανάπτυξη όγκων είναι μια σταδιακή διαδικασία δεδομένου ότι απαιτεί μια συσσώρευση μεταλλάξεων σε ικανοποιητικό αριθμό αυτών των γονιδίων. Οι μεταλλαγμένες μορφές άλλων κατηγοριών γονιδίων μπορούν επίσης να συμμετέχουν στη δημιουργία μίας κακοήθειας, ιδιαίτερα στη διευκόλυνση της εμφάνισης των μεταστατικών μορφών καρκίνου.

Οι περιβαλλοντικές αιτίες του καρκίνου περιλαμβάνουν μια εξαιρετικά διαφορετική ομάδα παραγόντων που μπορεί να ενεργήσει καρκινογενετικά, είτε με το ν' αλλοιώσει τα γονίδια είτε με την προώθηση του μη φυσιολογικού πολλαπλασιασμού κυττάρων (Nagao, 1985, Sugimura, 1986, Koehnlechner, 1987, Wakabayashi, 1987, Greenwald, 1996). Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες έχουν προσδιοριστεί μέσω των επιδημιολογικών μελετών, αν και η ακριβής φύση της δραστηριότητάς τους σε βιολογικό επίπεδο παραμένει σκοτεινή. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν χημικές ουσίες (όπως ο καπνός, ο αμίαντος, τα βιομηχανικά απόβλητα και τα φυτοφάρμακα), διατροφή (το κορεσμένο λίπος, κρεατοφαγία, παχυσαρκία), ακτινοβολία ιονισμού, παθογόνα (όπως ο ιός *Epstein-Barr*, ο ιός της *ηπατίτιδας Β* ή *С*, οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων (*papillomaviruses*) και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*pylori Helicobacter*). Εντούτοις, για τους περιβαλλοντικούς παράγοντες για να έχουν μια σημαντική επίδραση, κάποιος πρέπει να εκτεθεί σε αυτούς για έναν σχετικά μακροχρόνιο διάστημα.

Ο καρκίνος μπορεί επίσης να προκύψει, ή να επιδεινωθεί, ως αποτέλεσμα της φυσιολογικής πίεσης (στρες). Παραδείγματος χάριν, μία μεγάλης κλίμακας μελέτη στο Ισραήλ κατέδειξε ότι τα ποσοστά επιβίωσης μειώθηκαν για τους ασθενείς που είχαν χάσει τουλάχιστον ένα παιδί στον πόλεμο (Anonymous, 2000).

1.5.2. Ταξινόμηση των τύπων καρκίνου

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να ταξινομηθεί ο καρκίνος. Μια γενική ταξινόμηση αφορά τον τύπο ιστού όπου ένας όγκος προκύπτει. Παραδείγματος χάριν, τα σαρκώματα είναι καρκίνοι των συνδετικών ιστών, τα γλοιώματα είναι καρκίνοι από τα μη νευρονικά κύτταρα του εγκεφάλου και τα καρκινώματα (οι πιο κοινές μορφές καρκίνου) δημιουργούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Σε πρόσφατη μελέτη, έγινε ταξινόμηση των σημαντικών ασθενειών καρκίνου, σύμφωνα με το προσφάτως εκτιμώμενο ποσοστό επιβίωσης του προσβληθέντα ασθενή σε πενταετή βάση και διακρίνονται οι εξής κατηγορίες (Kintzios, 2004):

- ◆ *Καρκίνοι με λιγότερο από 20% ποσοστό επιβίωσης σε πενταετή βάση (σε όλα τα στάδια):*

- ◆ Καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος συσχετίζεται με έκθεση σε τοξίνες του περιβάλλοντος, όπως καπνός τσιγάρου και διάφορα χημικά, εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 17%. Μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δυο τύπους: μικρών κυττάρων (μικροκυτταρικός) (ταχύτατα διαδιδόμενος) και μη μικρών κυττάρων ασθένεια (μη μικροκυτταρικός). Με ποσοστό προσβεβλημένων ασθενών που καταλήγουν, μεγαλύτερο του 26%, αποτελεί μια από τις λιγότερο ιάσιμες μορφές καρκίνου.

- ◆ Καρκίνος του παγκρέατος, που συνδέεται με την γήρανση, το κάπνισμα, την κατανάλωση λιπαρών, την φυλή και διάφορες παγκρεατικές ασθένειες. Η διάγνωση συνήθως καθυστερεί και γίνεται μετά την εμφάνιση μετάστασης.

- ◆ *Καρκίνοι με ποσοστό επιβίωσης σε πενταετή βάση από 40% μέχρι 60% (σε όλα τα στάδια):*

- ◆ *Non-Hodgkin's* λέμφωμα, που συνδέεται με δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, περιλαμβάνοντας πολλές διαφορετικού τύπου ασθένειες.

- ◆ Καρκίνος των νεφρών, που συνδέεται με το γένος (άρρενες), το κάπνισμα και την παχυσαρκία.

- ◆ Καρκίνος των ωοθηκών, συνδέεται με την γήρανση και την κληρονομικότητα ιδιαίτερος σε περιπτώσεις μετάλλαξης των γονιδίων *BRCA1* ή *BRCA2*.

- ◆ *Καρκίνοι με ποσοστό επιβίωσης σε πενταετή βάση από 60% μέχρι 80% (σε όλα τα στάδια):*

- ◆ Γυναικολογικός (τραχηλικός και ενδομήτριος) καρκίνος, συνδέεται με την ορμονοθεραπεία (όπως θεραπεία υποκατάστασης οιστρογόνων), την φυλή, την σεξουαλική δραστηριότητα και το ιστορικό εγκυμοσύνης. Μπορεί να προβλεφθεί αποτελεσματικά από το ΠΑΠ-ΤΕΣΤ (που έχει ονομαστεί από τον εφευρέτη του τεστ Ιατρό Γ. Παπανικολάου).

- ◆ Λευχαιμία, που διακρίνεται σε: οξεία λεμφοκυτταρική (συνήθης στα παιδιά), οξεία μυελογενή και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η ασθένεια συνδέεται με γενετικές ανωμαλίες, ιογενείς προσβολές και έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες ή ακτινοβολία.

- ◆ Καρκίνος του εντέρου που συσχετίζεται με την κληρονομικότητα, την παχυσαρκία, τους πολύποδες και τις παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος. Η

παρεμπόδιση μετάστασης του στο συκώτι είναι κρίσιμης σημασίας. Η ασθένεια συνδέεται πιθανά με αυξημένες συγκεντρώσεις του καρκινικού εμβρυϊκού αντιγόνου (CEA).

- ◆ Καρκίνος της ουροδόχου κύστης, ο οποίος συνδέεται με το γένος, το κάπνισμα και την έκθεση σε τοξίνες του περιβάλλοντος.

- ◆ *Καρκίνοι με ποσοστό επιβίωσης σε πενταετή βάση μεγαλύτερο του 80 % (σε όλα τα στάδια):*

- ◆ Καρκίνος του προστάτη, συσχετίζεται με την μεγάλη ηλικία, την παχυσαρκία, το γένος. Τα ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας είναι υψηλά, μεγαλύτερα του 15%. Η ασθένεια μπορεί να ανιχνευθεί αποτελεσματικά στα αρχικά της στάδια με την χρήση του ειδικού αιματολογικού τεστ (PSA).

- ◆ Καρκίνος του μαστού, συνδέεται με την γήρανση και την κληρονομικότητα ιδιαίτερος σε περιπτώσεις μετάλλαξης των γονιδίων *BRCA1* ή *BRCA2*, την σεξουαλική δραστηριότητα, την παχυσαρκία και το ιστορικό εγκυμοσύνης. Παρόλο που τα ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας είναι υψηλά, μεγαλύτερα του 24%, τα ποσοστά επιβίωσης έχουν αυξηθεί κατά πολύ. Η ασθένεια μπορεί να ανιχνευθεί στα αρχικά στάδια μέσω της αυτοεξέτασης και της μαστογραφίας. Επιπλέον η ασθένεια σχετίζεται πιθανά με υψηλές συγκεντρώσεις του καρκινικού δείκτη CA13-5 στο αίμα.

- ◆ Καρκίνος του δέρματος (βασικών κυττάρων, πλακωδών κυττάρων, μελάνωμα), είναι κυρίως συσχετισμένος με την παρατεταμένη έκθεση στον ήλιο και την φυλή. Η ανίχνευσή του σε πρώιμα στάδια είναι εξαιρετικά κρίσιμη.

Οι περισσότερες μορφές καρκίνου, προς το παρόν, αυξάνονται σε συχνότητα. Ωστόσο η αύξηση των κρουσμάτων των φαρμακολογικά ελεγχόμενων καρκίνων, όπως του στήθους, του παχέως εντέρου, του πνεύμονα, των ωοθηκών, του προστάτη, οφείλεται μάλλον στην αύξηση του πληθυσμού παρά σε αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης της ασθένειας. Ο καρκίνος του μαστού είναι η κυρίαρχη μορφή καρκίνου στην εποχή μας ακολουθούμενος από τον καρκίνο του προστάτη, του παχέως εντέρου, του πνεύμονα και των ωοθηκών κατά σειρά. Δεν είναι παράξενο, με δεδομένο ότι ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που προκαλείται από ατέλειες στην αντιγραφή του DNA, πως η πιθανότητα ανάπτυξης των περισσότερων μορφών καρκίνου αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας. Για κάποιες μάλιστα από τις ορμονικά προκαλούμενες μορφές καρκίνου, η πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας αυξάνει ταχύτατα κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης. Τα ποσοστά διάγνωσης είναι συνεπώς πολύ υψηλά, πάνω από 95% για τον καρκίνο του προστάτη και πάνω από 99% για τον καρκίνο του στήθους, του εντέρου, του πνεύμονα και των ωοθηκών (Sidranski, 1996). Το στάδιο του καρκίνου του ασθενούς κατά την διάγνωση ποικίλει κατά πολύ για κάθε διαφορετικό τύπο καρκίνου. Οι χρόνοι επιβίωσης που σχετίζονται με την ασθένεια μειώνονται δραστικά με την διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο.

1.6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.6.1. Συμβατικές Μέθοδοι αντιμετώπισης του καρκίνου.

Οι συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης του καρκίνου περιλαμβάνουν την χειρουργική αφαίρεση, τις ακτινοβολίες και την χημειοθεραπεία. Η χειρουργική μέθοδος εφαρμόζεται για την αφαίρεση ενός όγκου. Είναι η πιο παλιά και ευρέως διαδεδομένη μέθοδος αντιμετώπισης του καρκίνου. Μεταξύ των μειονεκτημάτων της μεθόδου είναι η πιθανή (συχνά αναπόφευκτη) ζημιά υγιών ιστών ή οργάνων, όπως οι λεμφαδένες και η αδυναμία αφαίρεσης μεταστατικών κυττάρων ή όγκων που δεν είναι ορατοί από τους χειρουργούς. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω αύξηση του πολλαπλασιασμού των μικρών όγκων (pet-cancers) (Koehnlechner, 1987). Η ακτινοβολία (ακτίνες X, γ-ακτίνες) σε καρκινικούς όγκους, προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή την απόπτωση αυτών, διατηρώντας την ανατομική δομή γύρω από τον όγκο και επίσης, καταστρέφει τους καρκινικούς όγκους που δεν είναι ορατοί, δυστυχώς όμως δεν καταστρέφει τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Η θεραπεία με ακτινοβολία παρουσιάζει ανεπιθύμητες ενέργειες (όπως νευροτοξικότητα στα παιδιά), αλλά οι ασθενείς συνέρχονται πολύ γρηγορότερα από ότι μετά από χειρουργείο. Επιπλέον, ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίζονται είναι η ασθένιση του ανοσοποιητικού συστήματος και η αντικατάσταση των κατεστραμμένων ιστών από συγγενείς ιστούς (Koehnlechner, 1987).

Η χημειοθεραπεία βασίζεται στη συστηματική χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία κατανέμονται σε όλο το σώμα με την κυκλοφορία του αίματος. Η χημειοθεραπεία αποσκοπεί στην εξόντωση όλων των καρκινικών εστιών στο σώμα του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων και των μεταστάσεων. Παρόλα αυτά, η πλειονότητα των συχνότερων καρκίνων δεν μπορούν να θεραπευτούν μόνο με χημειοθεραπεία. Αυτό το είδος θεραπείας έχει επίσης πολλές παρενέργειες, όπως ναυτία, αναιμία, ανοσοανεπάρκεια, διάρροια, εμετούς και τριχόπτωση. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αναπτύξουν αντοχή στα χημειοθεραπευτικά (Koehnlechner, 1987, Barbounaki-Konstantakou, 1989).

Τα φάρμακα στη συμπληρωματική θεραπεία δεν επιτίθενται άμεσα στον όγκο, αλλά θεραπεύουν τις παρενέργειες και τα προβλήματα ανοχής που σχετίζονται με τη χρήση της χημειοθεραπείας. Για παράδειγμα, τα αντιεμετικά, όπως η *ονδανσετρόνη* ή η *γρανισετρόνη*, ελαττώνουν τα επίπεδα της ναυτίας που προκαλούν κάποιες χημειοθεραπείες. Έτσι, βελτιώνεται η συμμόρφωση και οι ασθενείς ανέχονται υψηλότερες δόσεις χημειοθεραπείας. Παρομοίως, κάποια φάρμακα, όπως η *ερυθροποιητίνη άλφα*, εστιάζουν στις ανωμαλίες των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλεί η χημειοθεραπεία και επαναφέρουν σε κάποιο βαθμό τη φυσιολογική τους λειτουργία. Στις μέρες μας, χρησιμοποιούνται πολλές διαφορετικές ουσίες (συχνά σε συνδυασμό). Η χημειοθεραπεία είναι το ταχύτερα αναπτυσσόμενο πεδίο της αντικαρκινικής θεραπείας, καθώς νέα φάρμακα δοκιμάζονται και ελέγχονται συνεχώς. Σε αυτά περιλαμβάνονται και φυτικοί μεταβολίτες καθώς και τροποποιητές του ενδοκρινικού συστήματος (σημαντικοί σε περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, όπως καρκίνος του μαστού και του προστάτη). Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα ταξινομούνται σε δέκα γενικές ομάδες (Κίντζιος, 2004):

- ♦ *Ατιμεταβολίτες*: δρουν ως ανενεργά ανάλογα απαραίτητων μεταβολιτών στο κύτταρο, παρεμποδίζοντας φυσιολογικές λειτουργίες του όγκου.

- ♦ *Αλκυλιωτικοί παράγοντες*: συνδέονται χημικά με το DNA με τη βοήθεια των αλκυλοομάδων τους, αλλοιώνοντας τη γονιδιακή δομή και λειτουργία, ή με πρωτεΐνες, αναστέλλοντας την ενζυμική τους δράση.

♦ *Αναστολείς της τοποϊσομεράσης:* αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, όπως είναι τα καρκινικά.

♦ *Φυτικά αλκαλοειδή:* αναστέλλουν επίσης την κυτταρική διαίρεση των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας τον αποπολυμερισμό των μικροσωληναρίων, διαδικασία απαραίτητη για τον αποχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση. Τα καινούρια *φυτικά αλκαλοειδή*, όμως, παρουσιάζουν και άλλους μηχανισμούς δράσης.

♦ *Αντιβιοτικά:* παράγονται από ποικίλες ομάδες μικροοργανισμών ή συντίθενται εργαστηριακά και εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA και την πρωτεϊνοσύνθεση.

♦ *Ανθρακυκλίνες:* είναι μια υποομάδα αντιβιοτικών που έχει συσχετιστεί με σημαντικές παρενέργειες στην καρδιά και στο μυελό των οστών.

♦ *Ένζυμα:* ειδικά τα *πρωτεολυτικά* και τα *ινωδολυτικά*, καθώς και οι *αναστολείς της τυροσινάσης*, όπως το *Gleevec*, ένα νέο κυτταροτοξικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στην θεραπεία της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας.

♦ *Ορμόνες:* είναι ουσίες που αλληλεπιδρούν με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες για τη ρύθμιση του ενδοκρινικού συστήματος. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την καταπολέμηση καρκινωμάτων του μαστού, του προστάτη και του ενδομητρίου.

♦ *Ανοσοτροποποιητικά:* αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του όγκου ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

♦ Διάφορες ουσίες που δεν ανήκουν σε καμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες.

Η επιτυχία της χημειοθεραπείας εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου. Έχει θεραπευτική δράση σε σπάνιους καρκίνους, όπως είναι το λέμφωμα Burkitt, ο όγκος του Wilms, τα τερατώματα και η λεμφοβλαστική λευχαιμία. Λιγότερο ικανοποιητικά δρα στη μυελοβλαστική λευχαιμία, το πολλαπλό μυέλωμα, τον καρκίνο των ωοθηκών, του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας και του μαστού, βελτιώνοντας ωστόσο την επιβίωση των ασθενών. Η αναμενόμενη δραστηριότητα είναι ελάχιστη στο βρογχοπνευμονικό καρκίνο, τον καρκίνο του στομάχου, τον ορθοπρωκτικό, τον παγκρεατικό, το νεφρικό, τον εγκεφαλικό, τον ενδοκρινικό και το δερματικό καρκίνο, καθώς και στα οστικά σαρκώματα.

Η χορήγηση φαρμακολογικής θεραπείας για τον καρκίνο ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και το είδος του καρκίνου. Οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχουν την υψηλότερη πιθανότητα να αντιμετωπιστούν με φάρμακα, σε ποσοστό 99% ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Οι ασθενείς με καρκίνο του προστάτη έχουν τη μικρότερη πιθανότητα να αντιμετωπιστούν με φάρμακα, καθώς μόνο το 42% λαμβάνει φάρμακα ως θεραπεία πρώτης γραμμής.

Οι καρκίνοι εκείνοι που εκδηλώνονται ως συμπαγείς όγκοι, θεραπεύονται αποτελεσματικότερα με τη χειρουργική εκτομή ή αφαίρεση της καρκινικής μάζας, καθώς έτσι ελαττώνεται η ικανότητα του όγκου να μεγαλώνει και να μεθίσταται σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος. Όταν ένας όγκος μπορεί ν' αφαιρεθεί ολοσχερώς, δεν υπάρχουν θεωρητικά πλεονεκτήματα από τη χορήγηση χημειοθεραπείας, αφού με την επέμβαση μηδενίζεται η ικανότητα του όγκου να μεγαλώνει και να διασπείρεται. Συνεπώς, οι όγκοι σταδίου I και II που έχουν μέγεθος μπάλας του γκολφ και μπορούν να αφαιρεθούν ολοσχερώς, σπάνια θεραπεύονται με φάρμακα. Στα στάδια III και IV, οι όγκοι συνήθως έχουν μεγάλο μέγεθος ή έχουν διασπαρεί σε τέτοιο βαθμό, ώστε να είναι αδύνατη η πλήρης αφαίρεσή τους. Για παράδειγμα, οι όγκοι του ορθού στο στάδιο III έχουν συνήθως διηθήσει τη λεκάνη, με αποτέλεσμα ο χειρουργός να μην μπορεί να τους αφαιρέσει ολοσχερώς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η φαρμακοθεραπεία χορηγείται είτε για να μειώσει το μέγεθος του όγκου πριν την εκτομή, είτε για να καταστρέψει εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα. Η

φαρμακοθεραπεία επομένως χορηγείται κατ' εξοχήν σε όγκους που διαγιγνώσκονται σε στάδιο III ή IV, καθώς και σε όγκους που υποτροπιάζουν μετά την αρχική θεραπεία ή έχουν κάνει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές.

1.6.2. Προηγμένες αντικαρκινικές θεραπείες

Ανοσοθεραπεία

Οι λοιμώδεις παράγοντες που εισέρχονται στο σώμα αντιμετωπίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Φέρουν διακριτά μόρια που καλούνται αντιγόνα, τα οποία αποτελούν στόχο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως είναι τα μακροφάγα, που περιφέρονται στο σώμα και κατατέμνουν τα αντιγόνα σε αντιγονικά πεπτίδια. Αυτά, στη συνέχεια, συνενώνονται με τα μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), τα οποία παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνεια.

Τα μακροφάγα, που φέρουν διάφορους συνδυασμούς MHC-πεπτιδίων, ενεργοποιούν τα ειδικά T-λεμφοκύτταρα, για να πολλαπλασιαστούν και να εκκρίνουν τις λεμφοκίνες. Οι λεμφοκίνες ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα, τα οποία μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν τα ελεύθερα αντιγόνα με μοριο-ειδικό μηχανισμό. Τα ενεργοποιημένα B-κύτταρα πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν αντισώματα, τα οποία συνδέονται με τα αντιγόνα και τα εξουδετερώνουν με μια ποικιλία μηχανισμών (Nossal, 1993).

Τα λεμφοκύτταρα παράγονται στα πρωτεύοντα όργανα του λεμφικού συστήματος: το θύμο (T κύτταρα) και το μυελό των οστών (B κύτταρα). Στη συνέχεια τροποποιούνται στα δευτερεύοντα όργανα του λεμφικού συστήματος, όπως είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και οι αμυγδαλές και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Σε μια ιδανική κατάσταση, τα καρκινικά κύτταρα θα αποτελούσαν στόχο του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Για να ξεχωρίσει τα καρκινικά κύτταρα, η ανοσοθεραπεία πρέπει να μπορεί να τα διαχωρίσει από τα φυσιολογικά κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια των μονοκλωνικών αντισωμάτων, έχουν ανακαλυφθεί ποικίλα αντιγόνα που βρίσκονται στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Πολλά από αυτά σχετίζονται με παθολογικές πρωτεΐνες που προκύπτουν από γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες μετατρέπουν τα φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Παρόλα αυτά, τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν την καταστροφή τους από τα λεμφοκύτταρα, ακόμα και αν φέρουν διακριτά αντιγόνα, λόγω της απουσίας συνεργικών μορίων, όπως είναι το B7 ή με τη βοήθεια ανοσοκατασταλτικών μηχανισμών. Ο απώτερος στόχος της έρευνας στην αντικαρκινική ανοσοθεραπεία είναι η παραγωγή ενός αποτελεσματικού εμβολίου. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει ακέραια καρκινικά κύτταρα, καρκινικά πεπτίδια ή μόρια DNA, άλλες πρωτεΐνες ή ιούς (Koehnlechner, 1987, Old, 1996). Η ιδέα του εμβολίου είναι στην πραγματικότητα πολύ παλιά. Το 1892, στο Νοσοκομείο Memorial της Νέας Υόρκης, ο William B. Coley θέραπευε ασθενείς με καρκίνο χορηγώντας τους νεκρά βακτήρια, έτσι ώστε να προκαλέσει ογκοκατασταλτική ανοσοαπάντηση.

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου μπορεί αδρά να ταξινομηθεί στις ακόλουθες κατηγορίες :

- ♦ *Μη-ειδική*: περιλαμβάνει τη γενική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και την παραγωγή κυτοκινών, όπως ιντερφερονών, παράγοντα νέκρωσης όγκων (*Tumor Necrosis Factor, TNF*), ιντερλευκινών (*IL-2, IL-12*) και *GM-CSF*.

♦ *Παθητική*: περιλαμβάνει τη χορήγηση «εξανθρωπισμένων» μονοκλωνικών αντισωμάτων από ποντίκια, τα οποία φέρουν ένα τοξικό παράγοντα (όπως κάποιο ραδιενεργό ισότοπο ή χημειοθεραπευτικό φάρμακο).

♦ *Ενεργητική*: τα εμβόλια φτιάχνονται με πρότυπο τα ανθρώπινα αντικαρκινικά αντισώματα

♦ *Με αυτόλογα κύτταρα*: περιλαμβάνει λεμφοκύτταρα από τον ίδιο τον ασθενή. Σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει 40% μείωση της επίπτωσης της λευχαιμίας σε ποντίκια. Έχει αναφερθεί ότι επιμηκύνει το προσδόκιμο επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο και λευχαιμία που ελάμβαναν συμβατική θεραπεία. Έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση μελανωμάτων, καρκίνων του πνεύμονα και του μαστού. Έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση διαφόρων καρκίνων του δέρματος.

Ένα παλαιότερο κτηνιατρικό αντιελμινθικό φάρμακο, η *λεβαμιζόλη* (*Ivamisol*) έχει παρουσιάσει μια ελαφρά μετεγχειρητική ανοσοενεργοποιητική ικανότητα, καθώς και αύξηση της επιβίωσης σε ασθενείς με βρογχικό καρκίνο, καρκίνο του πνεύμονα και καρκίνο του εντέρου.

Εκτός από τα φυτικά παράγωγα, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα με τρόπο λιγότερο ή περισσότερο αντικαρκινικό. Οι σημαντικότερες ουσίες και/ή οργανισμοί παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (προσαρμοσμένο από τον Koehnlechner, 1987). Άλλα χημειοθεραπευτικά μέσα είναι: ιχθυοστοιχεία (*σελήνιο, ψευδάργυρο, λίθιο*), αιμοκυανίνη και τα προπιονοβακτήρια.

Η *αναστολή της αγγειογένεσης* είναι μια ελπιδοφόρα στρατηγική αντιμετώπισης, που επικεντρώνεται στην αναστολή της καρκινικής αγγειογένεσης, δηλαδή του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων μέσα στους όγκους. Αυτά τα φάρμακα όχι μόνο έχουν δώσει εντυπωσιακά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα σε ζώα, αλλά αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο αντιμετώπισης πολυανθεκτικών όγκων που έχουν αποδειχτεί απρόσβλητοι από τη συμβατική χημειοθεραπεία. Η σχέση της αγγειογένεσης με την επέκταση του όγκου καταδείχτηκε από τον Judah Folkman στο Νοσοκομείο Παίδων της Βοστώνης (Folkman, 1996; Brower, 1999). Οι παρατηρήσεις του οδήγησαν στην έννοια της «αγγειογενετικής μετατροπής», μιας σύνθετης διεργασίας κατά την οποία μια καρκινική μάζα επεκτείνεται και ξεπερνά το ρυθμό της εσωτερικής της απόπτωσης αναπτύσσοντας αιμοφόρα αγγεία, δηλαδή μεταπίπτοντας σε αγγειογενετικό φαινότυπο. Τα φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή του σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων θα έπρεπε να έχουν ελάχιστες παρενέργειες, ακόμα και σε παρατεταμένη χορήγηση. Η εύκολη πρόσβαση των φαρμάκων στα αγγεία, καθώς και η εν δυνάμει εξάρτηση εκατοντάδων καρκινικών κυττάρων από ένα μοναδικό τριχοειδές αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματα αυτής της θεραπείας, η οποία όμως περιορίζεται στην υποομάδα των καρκινικών τριχοειδών που εκφράζουν πρώιμο αγγειογενετικό φαινότυπο. Ένα πρόσθετο πρόβλημα αποτελεί η ετερογένεια των αγγείων μέσα στους όγκους. Πολλές προσπάθειες αναστολής της αγγειογένεσης βρίσκονται ακόμα σε πρώιμη εξέλιξη, με περίπου 30 αντιαγγειογενετικά φάρμακα να βρίσκονται στο στάδιο της κλινικής δοκιμής. Από αυτά, οι ενδογενείς αναστολείς αγγειογένεσης, όπως η *αγγειοστατίνη*, η *τροπονίνη-1* και η *ενδοστατίνη*, βρίσκονται σε δοκιμές Φάσης I, ενώ οι συνθετικοί αναστολείς, όπως το *TNP-470*, διάφοροι πρωτεολυτικοί αναστολείς και οι ανταγωνιστές μεταβιβαστών βρίσκονται σε δοκιμές Φάσης II και III. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι ο αναστολέας αγγειογένεσης *σκουαλαμίνη* (*squalamine*) βασίζεται σε ουσία από ήπαρ καρχαρία. Οι χόνδροι από καρχαρίες πωλούνται ως εναλλακτική

αντικαρκινική θεραπεία από τις αρχές του 1990, όταν εκδόθηκε το βιβλίο του William Lance «Οι καρχαρίες δεν παθαίνουν καρκίνο». Το βιβλίο πρότεινε ότι υπάρχει μία πρωτεΐνη στους χόνδρους των καρχαριών που προφυλάσσει τα ψάρια από τους όγκους αναστέλλοντας την ανάπτυξη των μικρών αιμοφόρων αγγείων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Η ιδέα δημιούργησε μια αγορά για συμπληρώματα με βάση τον χόνδρο από καρχαρία, η οποία υπολογίζεται σε 50 εκατομμύρια δολάρια ετησίως. Έκτοτε, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι οι καρχαρίες παθαίνουν καρκίνο, απλά σε μικρότερο ποσοστό απ' ό,τι άλλα ψάρια και οι άνθρωποι. Δανοί ερευνητές δοκίμασαν τη θεραπεία σε 17 γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο μαστού, οι οποίες δεν είχαν ανταποκριθεί σε άλλες θεραπείες. Οι ασθενείς ελάμβαναν 24 κάψουλες από χόνδρο καρχαρία κάθε μέρα για τρεις μήνες, αλλά η ασθένεια συνέχισε την πορεία της σε 15 περιπτώσεις, ενώ μία ασθενής ανέπτυξε όγκο στον εγκέφαλο. Τα αποτελέσματα των Δανών ενισχύουν προηγούμενες έρευνες, που κατέδειξαν ότι η σκόνη από χόνδρο καρχαρία δεν κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη των όγκων σε 60 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο.

Πίνακας 1. : Παράγοντες που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα (προσαρμοσμένο από Koehnlechner, 1987)

Παράγοντας	Ενεργοποιεί
<i>Bordetella pertussi</i> <i>Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)</i> <i>Escherichia coli</i> Βιταμίνη Α	Μακροφάγα
<i>Corynebacterium parvum</i> <i>C. granulorum</i> <i>Bordetella pertussi</i> <i>Escherichia coli</i> Βιταμίνη Α	Β-λεμφοκύτταρα
<i>Bordetella pertussi</i> <i>Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)</i> <i>Escherichia coli</i> Βιταμίνη Α Πολυαδενοσίνη-πολυουρακίλη Σαπονίνη Λεβαμισόλη Lentinan Τοξίνη Διφθερίτιδας Παράγοντες Θύμου Αδένα	Τ-λεμφοκύτταρα

1.6.3. Άλλες προηγμένες θεραπείες

Οι προηγμένες αντικαρκινικές θεραπείες περιλαμβάνουν επίσης τη χρήση ιστοειδικών κυτταροτοξικών παραγόντων. Για παράδειγμα, έχουν αναπτυχθεί νέες μεταλλαξιόγones κυτταροτοξίνες (*ιντερλευκίνη 13 – IL13*) ενάντια στους εγκεφαλικούς όγκους, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των

φυσιολογικών ιστών, παρά μόνο με τα γλοιώματα του εγκεφάλου. (Beljanski, 1983, Beljanski, 1993).

1.6.4. Εναλλακτικές αντικαρκινικές θεραπείες

Αυτές περιλαμβάνουν ποικίλες, συνήθως αμφιλεγόμενες μεθόδους για τη θεραπεία του καρκίνου αποφεύγοντας τις παρενέργειες των συμβατικών μεθόδων. Η εναλλακτική θεραπεία του καρκίνου είναι πιθανό να αποκτήσει ακόμη μεγαλύτερη σημασία στο μέλλον, καθώς εκτιμάται ότι περίπου οι μισοί καρκινοπαθείς στρέφονται προς την εναλλακτική ιατρική. Οι περισσότερα υποσχόμενες εναλλακτικές αντικαρκινικές θεραπείες περιλαμβάνουν:

- ◆ Την χορήγηση *αντινεοπλαστονών*, δηλαδή πεπτιδίων που θεωρείται ότι αναστέλλουν την καρκινική ανάπτυξη και αναγνωρίστηκαν πρώτη φορά από τον Stanislaw Burzynski στο αίμα και τα ούρα. Σύμφωνα με τον αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) το φάρμακο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε πειραματικές δοκιμές, υπό τον έλεγχο του οργανισμού και σε ασθενείς που έχουν αποτύχει όλες οι συμβατικές θεραπείες. Εντούτοις, η θεραπεία αυτή έχει τύχει σημαντικής πολιτικής υποστήριξης, προσελκύοντας ταυτόχρονα ευρεία δημοσιότητα (Keiser, 2000).

- ◆ Τη *θειϊκή υδραλαζίνη (hydralazine sulfate)*, μια ουσία που καταπολεμά την καχεξία των καρκινοπαθών, βελτιώνοντας έτσι την επιβίωσή τους.

- ◆ Διάφορα φυτικά εκχυλίσματα.

1.6.5. Από την πηγή στον ασθενή: Δοκιμάζοντας τη δραστηριότητα ενός υποψήφιου αντικαρκινικού φαρμάκου

Η δημιουργία νέων φαρμάκων είναι υπόθεση ακριβή και ριψοκίνδυνη. Κατά μέσο όρο, ένα νέο φάρμακο χρειάζεται 15 χρόνια από τη στιγμή που θα ανακαλυφθεί μέχρι να φτάσει στην αγορά και κοστίζει 802 εκατομμύρια δολάρια (Nature reviews Drug Discovery, 2002). Έχουν καταβληθεί αξιοσημείωτες προσπάθειες από δημόσιους οργανισμούς και ιδιωτικές εταιρίες ώστε να επιταχυνθεί η διαδικασία ανακάλυψης και δημιουργίας φαρμάκων, επενδύοντας σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα από τα προκαταρκτικά στάδια των *in vitro* δοκιμασιών ελέγχου. Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Ηνωμένων Πολιτειών (United States National Cancer Institute, NCI) έχει εφαρμόσει υποδειγματικές στρατηγικές για την ανακάλυψη και δημιουργία νέων φυσικών αντικαρκινικών παραγόντων. Κατά τα τελευταία 40 χρόνια, το NCI έχει ασχοληθεί με την προκλινική ή/και κλινική αξιολόγηση της συντριπτικής πλειοψηφίας των παραγόντων υπό διερεύνηση για τη θεραπεία του καρκίνου. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, περισσότερες από 400.000 χημικές ουσίες, τόσο συνθετικές όσο και φυσικές, έχουν ελεγχθεί για αντικαρκινική δραστηριότητα (www.jola.gov).

Τα φυτικά υλικά που βρίσκονται υπό διερεύνηση για δοκιμασία αποτελεσματικότητας, αποτελούνται συνήθως από σύνθετα μίγματα διαφόρων συστατικών με διαφορετική διαλυτότητα σε υγρά καλλιεργητικά μέσα. Επιπλέον, μπορεί να περιέχουν και αδρανή πρόσθετα. Αυτές τους οι ιδιότητες καθιστούν αναγκαία την αναζήτηση των κατάλληλων συνθηκών δοκιμασίας. Στο παρελθόν, έχουν χρησιμοποιηθεί πρότυπα συστήματα είτε υψηλής πολυπλοκότητας (ζώα,

καλλιέργειες οργάνων), είτε χαμηλής μοριακής οργάνωσης (υποκυτταρικά κλάσματα, όργανα και κυτταρικά ομογενοποιημένα), για την αξιολόγηση του μηχανισμού δράσης των φυτοφαρμακευτικών ουσιών. Την τελευταία δεκαετία, όμως, έχει παρατηρηθεί μια μεγάλη στροφή προς τα απομονωμένα κυτταρικά συστήματα, κυρίως κύτταρα σε καλλιέργειες και κυτταρικές σειρές (Gebhardt, 2000). Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός διαφορετικών *in vitro* συστημάτων αξιολόγησης μπορεί όχι μόνο να ενισχύσει τη δυνατότητα ανίχνευσης ενεργών συστατικών, αλλά και να οδηγήσει σε καλύτερα συμπεράσματα για τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης και τις θεραπευτικές επιδράσεις.

1.6.5.1. Προκλινικές δοκιμασίες

Οι προκλινικές δοκιμασίες συνήθως περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας ενός υποψήφιου αντικαρκινικού παράγοντα *in vitro*, δηλαδή σε κύτταρα καλλιεργημένα σε συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Κάποιες νεοπλασματικές ζωικές κυτταρικές σειρές έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα γι' αυτό το σκοπό. Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί ζωικά συστήματα που φέρουν συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Για παράδειγμα, τα υλικά που εισέρχονταν στο πρόγραμμα ανακάλυψης φαρμάκων του NCI από το 1960 ως το 1982 δοκιμάζονταν πρώτα χρησιμοποιώντας τα μοντέλα λευχαιμικών ποντικών L1210 και P-388. Τα περισσότερα φάρμακα που ανακαλύφθηκαν εκείνη την περίοδο, και είναι τώρα διαθέσιμα για τη θεραπεία του καρκίνου, είναι κυρίως αποτελεσματικά ενάντια σε ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους, όπως λευχαιμίες και λεμφώματα, αλλά με ορισμένες εξαιρέσεις, όπως η *πακλιταξέλη* (*paclitaxel*), παρουσιάζουν ελάχιστη δραστηριότητα ενάντια σε βραδέως αναπτυσσόμενους στερεούς όγκους των ενηλίκων, όπως καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του παγκρέατος και του εγκεφάλου. Μια περισσότερο αποτελεσματική και προσανατολισμένη στη νόσο διαδικασία ελέγχου θα έπρεπε να περιλαμβάνει πολλαπλά νοσοειδικά (π.χ. ειδικά για κάθε τύπο όγκου) μοντέλα και θα έπρεπε να επιτρέπει την ανίχνευση τόσο ευρέως φάσματος όσο και νοσοειδικής δραστηριότητας. Η χρήση πολλαπλών *in vivo* ζωικών μοντέλων δεν είναι ιδιαίτερα εύχρηστη για έλεγχο τέτοιου είδους, με δεδομένο το εύρος των απαιτήσεων για πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού ελέγχων και ειδική αντιπροσώπευση κάθε τύπου όγκου. Η διαθεσιμότητα, όμως, μεγάλης ποικιλίας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, που αντιπροσώπευαν πολλές διαφορετικές μορφές ανθρώπινων κυτταρικών τύπων, παρείχε την κατάλληλη αφετηρία για την ανάπτυξη νοσοκατευθυνόμενων προγραμμάτων *in vitro* πρώιμης επιλογής από το 1985 μέχρι το 1990. Η τρέχουσα διαδικασία ελέγχου που έχει δημιουργηθεί από το NCI περιλαμβάνει 60 κυτταρικές σειρές που προέρχονται από εννιά καρκινικούς τύπους και είναι οργανωμένες σε υποομάδες που αντιπροσωπεύουν τη λευχαιμία, τον καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του κεντρικού νευρικού συστήματος, των ωοθηκών, του νεφρού, του προστάτη, του μαστού και το μελάνωμα. Η διαδικασία ελέγχου για τον καθορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης και βιωσιμότητας είναι μια διαδικασία σήμανσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιεί *σουλφοροδοαμίνη Β* (*sulforhodamine B*, *SRB*). Η βιβλιογραφία αναφέρει και άλλες, πιο εξεζητημένες μεθόδους. Επιπροσθέτως, οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* διαλογή μπορούν να αναλυθούν ως προς την περιεκτικότητά τους σε μοριακούς στόχους, όπως η *p-γλυκοπρωτεΐνη*, το *p53*, το *Ras* και το *BCL2*. Από κάθε επιτυχή δοκιμασία μιας ένωσης προκύπτουν 60 καμπύλες δόσης-απόκρισης, που δημοσιεύονται στην έκθεση δεδομένων ελέγχου του NCI ως μία σειρά συνθέσεων

που περιλαμβάνουν τις ογκοειδικές υποομάδες, καθώς και μία σύνθεση που περιλαμβάνει το σύνολο της ομάδας. Τα δεδομένα των κυτταρικών σειρών που δεν πληρούν τα κριτήρια του ελέγχου ποιότητας αποκλείονται από περαιτέρω ανάλυση και διαγράφονται από την έκθεση ελέγχου.

Η *in vitro* χρήση ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών για έλεγχο έχει τύχει ευρείας εφαρμογής στην ταξινόμηση συστατικών ανάλογα με τη χημική τους δομή και /ή το μηχανισμό δράσης. Πολύτιμες πληροφορίες προκύπτουν από τον καθορισμό του βαθμού ομοιότητας των προφίλ που παράγονται από το ίδιο ή διαφορετικά συστατικά.

Οι κλινικές δοκιμές είναι έρευνες που αξιολογούν την αποτελεσματικότητα των νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αντικαρκινικών κλινικών δοκιμών. Αυτές περιλαμβάνουν:

- δοκιμές πρόληψης, σχεδιασμένες να εμποδίσουν την ανάπτυξη καρκίνου σε άτομα προηγουμένως υγιή,

- δοκιμές πρόληψης, σχεδιασμένες να εμποδίσουν την υποτροπή του καρκίνου σε πρώην καρκινοπαθείς,

- δοκιμές πρόωμης ανίχνευσης, για τη διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμα στάδια,

- δοκιμές ποιότητας ζωής, για την ανακούφιση και βελτίωση της ποιότητας ζωής των καρκινοπαθών,

- έρευνες για την ανεύρεση τρόπων να τροποποιηθούν πρότυπα συμπεριφοράς που προκαλούν καρκίνο, όπως το κάπνισμα.

1.6.6. Φάσεις των κλινικών δοκιμών

Το μεγαλύτερο τμήμα της κλινικής έρευνας που αφορά στη δοκιμασία ενός νέου φαρμάκου πραγματοποιείται με μια αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία βημάτων (NCI, 2001). Αυτό επιτρέπει στους ερευνητές να θέτουν και να απαντούν σε ερωτήματα με τρόπο που επεκτείνει τις πληροφορίες σε σχέση με το φάρμακο και την επίδρασή του στους ανθρώπους. Με βάση τα συμπεράσματα εργαστηριακών πειραμάτων ή προηγούμενων δοκιμών, οι ερευνητές σχηματίζουν υποθέσεις ή ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν. Στη συνέχεια, σχεδιάζουν προσεκτικά μια κλινική δοκιμή, ώστε να ερευνήσουν την υπόθεση και να απαντήσουν στο ερευνητικό ερώτημα. Συνηθίζεται, διάφορα είδη δοκιμών να διαχωρίζονται σε φάσεις, που ακολουθούν η μία την άλλη με αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία. Γενικά, μια κλινική δοκιμή για τον καρκίνο υπάγεται σε μία από τις ακόλουθες φάσεις:

◆ Δοκιμές Φάσης I

Οι πρώτες αυτές δοκιμές σε ανθρώπους αξιολογούν πώς πρέπει να χορηγείται το νέο φάρμακο (από του στόματος, ενδοφλεβίως, με ένεση), πόσο συχνά και σε τι δοσολογία. Μία δοκιμή Φάσης I συνήθως περιλαμβάνει μικρό αριθμό ασθενών, καθώς και 20 με 80 φυσιολογικούς, υγιείς εθελοντές. Οι δοκιμές μελετούν την ασφάλεια του φαρμάκου, συμπεριλαμβανομένου και του εύρους της ασφαλούς δοσολογίας. Οι έρευνες καθορίζουν επίσης το πώς ένα φάρμακο απορροφάται, κατανέμεται, μεταβολίζεται και εκκρίνεται, καθώς και τη διάρκεια της δράσης του. Αυτή η φάση διαρκεί περίπου ένα χρόνο.

◆ Δοκιμές Φάσης II

Μια δοκιμή Φάσης II παρέχει προκαταρκτικές πληροφορίες για τη δραστηριότητα του νέου φαρμάκου και συμπληρωματικές πληροφορίες για την ασφάλεια και το όφελος. Κάθε δοκιμή Φάσης II συνήθως επικεντρώνεται σε ένα

συγκεκριμένο είδος καρκίνου. Ελεγχόμενες έρευνες με περίπου 100 με 300 εθελοντές ασθενείς εκτιμούν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και διαρκούν περίπου δύο χρόνια

◆ *Δοκιμές Φάσης III*

Αυτές οι δοκιμασίες συγκρίνουν ένα ελπιδοφόρο νέο φάρμακο, ένα συνδυασμό φαρμάκων ή μια διαδικασία με το τρέχον πρότυπο. Οι δοκιμές *Φάσης III* συνήθως περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ανθρώπων σε ιδιωτικά ιατρεία, κλινικές και αντικαρκινικά κέντρα σε όλη τη χώρα. Αυτή η φάση διαρκεί περίπου τρία χρόνια και συνήθως περιλαμβάνει 1000 με 3000 ασθενείς σε κλινικές και νοσοκομεία. Οι ιατροί παρακολουθούν στενά τους ασθενείς, για να καθορίσουν την αποτελεσματικότητα και να αναγνωρίσουν τις ανεπιθύμητες ενέργειες.

Κάποιοι χρησιμοποιούν τον όρο *Φάση IV* για να περιγράψουν τη συνεχιζόμενη αξιολόγηση που πραγματοποιείται μετά την έγκριση από τον FDA, όταν το φάρμακο βρίσκεται ήδη στην αγορά και είναι διαθέσιμο για ευρεία κατανάλωση (φαρμακοεπαγρύπνηση - post-marketing surveillance).

1.6.6.1. Πρωτόκολλα κλινικών δοκιμασιών

Οι κλινικές δοκιμές συνήθως ακολουθούν αυστηρές επιστημονικές κατευθυντήριες γραμμές. Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές καθορίζουν πολλά ζητήματα, όπως το σχεδιασμό της έρευνας, ποιος μπορεί να συμμετάσχει και τι είδους πληροφορίες πρέπει να παρέχονται στους ανθρώπους όταν αποφασίζουν αν θα συμμετάσχουν. Κάθε δοκιμή έχει έναν διευθύνοντα ερευνητή, ο οποίος συνήθως είναι ιατρός. Ο ερευνητής προετοιμάζει ένα σχέδιο δράσης, το οποίο ονομάζεται πρωτόκολλο. Αυτό το σχέδιο εξηγεί τι θα κάνει η δοκιμή, πώς και γιατί. Για παράδειγμα, καθορίζει:

- Πόσοι άνθρωποι θα συμμετάσχουν.
- Ποιος δικαιούται να συμμετάσχει.
- Ποια ερευνητικά φάρμακα θα λάβουν οι συμμετέχοντες.
- Ποιες ιατρικές δοκιμασίες θα πραγματοποιούνται και πόσο συχνά.
- Τι πληροφορίες θα συλλεχθούν.

1.7. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

1.7.1. Η βιοτεχνολογία φυτών στη φαρμακευτική έρευνα

Η *in vitro* παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών από φυτικά κύτταρα αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τη τεχνολογία φυσικών προϊόντων και πιθανότατα μία άριστη εναλλακτική μορφή γεωργίας. Η προσέγγιση αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της παραδοσιακής (συμβατικής) παραλαβής ουσιών από ολόκληρα φυτά (Κίντζιος, 2007), γιατί:

- προσφέρει τη δυνατότητα ποιοτικού, ποσοτικού και χρονικού ελέγχου της παραγωγής.
- προσφέρει τη δυνατότητα παραγωγής εντελώς νέων συστατικών μέσω βιομετατροπής (ελέγχου του μεταβολισμού σε κυτταρικό επίπεδο)
- προσφέρει τη δυνατότητα γενετικής τροποποίησης των καλλιεργούμενων κυττάρων
- είναι αποτελεσματικότερη από την κλασική βελτίωση, μέσω της *in vitro* επιλογής καλύτερων (π.χ. παραγωγικότερων) γονότυπων
- σε πολλές περιπτώσεις, η παραγωγικότητα είναι μεγαλύτερη από αυτή ολόκληρου του φυτού ή συστήματος απομονωμένων ενζύμων

Στα φυτικά κύτταρα παράγονται μέσα από διάφορα δευτερογενή μεταβολικά μονοπάτια (δηλαδή εκτός του πρωτογενούς μεταβολισμού) χημικές ουσίες, οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτοί μπορεί να ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, όπως: οργανικά οξέα, αρωματικά συστατικά, τερπενοειδή, στεροειδή, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, καρβονύλια, κ.α. Οι ουσίες αυτές παίζουν διάφορους ρόλους στο φυτό, όπως προστασία από παθογόνα (*φυτοαλεξίνες*), λιγνινοποίηση, καθώς και ρύθμιση της αύξησης, της διαφοροποίησης και του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Από την άλλη πλευρά, παρουσιάζουν ποικίλη χρησιμότητα για τον άνθρωπο, με εφαρμογές στην ιατρική, ως καλλυντικά, πρόσθετα τροφίμων και ειδικά χημικά.

Ως βίο-δραστικά φυσικά προϊόντα χαρακτηρίζονται οι ουσίες οι οποίες παράγονται μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών. Η παγκόσμια αγορά βίο-δραστικών φυσικών προϊόντων προς χρήση φαρμακευτική, αγροχημική, καλλωπιστική ή ως πρόσθετα τροφίμων παρουσιάζει συνεχώς ανοδικές τάσεις (της τάξης του 5-10% ετησίως). Ειδικότερα στο τομέα της φαρμακολογίας, η χρήση των ουσιών αυτών καλύπτει κάθε κατηγορία σκευάσματος και ιδιαίτερα τα αντιφλεγμονώδη, αντισταμινικά, βακτήριο- και μυκο-στατικά, τροποποιητές του μεταβολισμού, ψυχοτροπικά αλλά και για την θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος ή λοιμώξεων όπως το AIDS.

Από τις διάφορες αιτίες για το φαινόμενο αυτό μπορούν να επισημανθούν ως κυριότερες οι εξής:

1. Η παραγωγή και εφαρμογή των φυσικών προϊόντων είναι σε γενικές γραμμές απαλλαγμένη από τις επιπλοκές οι οποίες συνοδεύουν τις συνθετικές χημικές ενώσεις, όπως τοξικότητα, ανεπιθύμητα ή άγνωστα παραπροϊόντα σύνθεσης, αλλεργιογόνος δράση, προώθηση της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών διαφόρων παθογόνων κλπ.
2. Σε αρκετές περιπτώσεις (όχι όμως όλες), το κόστος της χημικής σύνθεσης είναι σημαντικά υψηλότερο από το κόστος της φυσικής απομόνωσης ή της βιοτεχνολογικής παραγωγής μίας βίο-δραστικής ουσίας.
3. Περίπου το 75% όλων των γνωστών χημικών ενώσεων προέρχονται από το φυτικό βασίλειο, από το οποίο επίσης έχει απομονωθεί το 25% όλων των φαρμακευτικών ουσιών.
4. Λαμβανομένου υπ' όψιν ότι από το σύνολο των φυτικών ειδών μόνο το 1.6% (περίπου 5.000 είδη) έχει διερευνηθεί ως προς τη σύσταση του σε βίο-δραστικές ουσίες, υπάρχουν ευρύτατες προοπτικές για την απομόνωση νέων ουσιών και την δημιουργία νέων αγορών που θα συνοδεύουν τη χρήση των ουσιών αυτών.

Ειδικότερα όσον αφορά την Ελλάδα, ο αριθμός των αρωματικών ειδών με οικονομικό

ενδιαφέρον είναι τουλάχιστον τριπλάσιος του μέσου Ευρωπαϊκού όρου. Ωστόσο για πολλούς λόγους η

καλλιέργεια των ειδών αυτών δεν είναι συστηματοποιημένη ούτε έχει επεκταθεί σε ιδιαίτερο βαθμό.

Κατά συνέπεια, η παραγωγή - αξιοποίηση των ουσιών που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον

από βιολογική-χημική άποψη είναι περιορισμένη, κυρίως γιατί υπάρχει δυσκολία παραγωγής και

διάθεσης μεγάλων ποσοτήτων τους.

1.7.2. Βιοτεχνολογία και πρώτη ύλη ή φυσικά προϊόντα

Παρ' όλη την πληθώρα φυτικών μεταβολιτών με αντικαρκινικές και ανοσο-διεγερτικές ιδιότητες, η φυσική οδός παραγωγής αυτών μπορεί να μην είναι η ιδανική πηγή αντικαρκινικών φαρμάκων. Αρκετοί λόγοι οδηγούν στην άποψη ότι η παραγωγή ουσιών από φυσικά προϊόντα είναι λιγότερο ελκυστική από άλλους τρόπους παραγωγής, όπως για παράδειγμα την χημική σύνθεση αυτών, όταν βέβαια αυτό είναι εφικτό:

Πρώτα απ' όλα το θέμα της τροφοδοσίας φυσικού υλικού. Σε πολλές περιπτώσεις, οι ουσίες προέρχονται από αργά αναπτυσσόμενα είδη (π.χ. από το φλοιό ενός δέντρου), ή από είδη υπό εξαφάνιση. Ακόμη, η παραγωγή μπορεί να είναι εξαιρετικά χαμηλή, ενώ οι ανάγκες πολύ μεγαλύτερες (ειδικά στις περιπτώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών). Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις της *ταξόλης* στις βελόνες και τον αποξηραμένο κορμό του *Taxus brevifolia* είναι περίπου 0.01-0.1%, ενώ οι ανάγκες σε ποσότητα για την θεραπεία με αυτήν πολύ μεγαλύτερες. Συγκεκριμένα για την *ταξόλη* το πρόβλημα μπορεί επιμέρους να λυθεί με την χημική σύνθεση του προϊόντος (Cragg, 1998).

Επίσης τα φαρμακευτικά φυτικά εκχυλίσματα συχνά δεν έχουν την απαιτούμενη σταθερότητα που θα τα καθιστά αξιόπιστα για μεγάλης έκτασης κλινικές εφαρμογές. Αυτό το πρόβλημα συνδέεται με διάφορους παράγοντες, όπως η εξάρτηση της παραγωγής από περιβαλλοντικούς παράγοντες και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (π.χ. άνθιση), καθώς και με την ανομοιογένεια των εκχυλισμάτων, που κάνουν την καλύτερη απομόνωση και τον καθαρισμό ένα απαραίτητο αλλά και δαπανηρό μέτρο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το εκχύλισμα *λεκτίνης* του ιξού που παρουσιάζει μια αξιοπρόσεκτη εποχική διακύμανση στα επίπεδα των *ML ισολεκτινών* (ML I, ML II και ML III) (Pfuller, 2000). Ακόμη, η εξειδικευμένη βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος παρουσιάζει διακύμανση σε μια μακρά περίοδο αποθήκευσης (π.χ. δυο έτη) (Lorch, 2000).

Η βιοτεχνολογία θα μπορούσε να προσφέρει εναλλακτικές μεθόδους παραγωγής σημαντικών ποσοτήτων φυτικής βιομάζας ή φυσικών προϊόντων σε σχετικά σύντομο χρόνο. Οι τεχνικές *in vitro* είναι βασικός κλάδος της βιοτεχνολογίας φυτών, αφού επιτρέπουν να ελέγχονται τεχνητά αρκετές παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των καλλιεργούμενων ιστών. Με απλά λόγια η ιστοκαλλιέργεια στηρίζεται στην αρχή του εμβολιασμού ενός εκφύτου (που είναι ένα τμήμα φυτικού ιστού όπως τμήμα φύλλου ή βλαστού) από ένα φυτό δότη σε ένα μέσο που περιέχει θρεπτικά στοιχεία και ρυθμιστές ανάπτυξης προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό ενός λίγο ή πολύ αποδιαφοροποιημένου ταχέως αναπτυσσόμενου κάλου. Η παραγωγή με αυτό τον τρόπο αντικαρκινικών παραγόντων (*in vitro*) μπορεί να έχει πλεονεκτήματα σε σχέση με την παραγωγή από φυτά (*in vivo*) (Κίντζιος, 2007) όπως:

- Με την αλλαγή των παραμέτρων καλλιέργειας πιθανό να μπορέσει να ελεγχθεί η ποσότητα, καθώς και ο χρόνος παραγωγής των εκχυλισμάτων του ιξού. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να ξεπεραστούν προβλήματα που σχετίζονται με την σταθεροποίηση των φυτικών εκχυλισμάτων.
- Με την τροφοδοσία των ιστοκαλλιέργειών με πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση συγκεκριμένων μεταβολιτών, μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγικότητα από καλλιεργούμενα κύτταρα (*in vitro*) παρά από ολόκληρα φυτά.

- Πιθανά μπορούν να συντεθούν εντελώς καινούριες ουσίες μέσω μιας διαδικασίας βιομετατροπής ή εκμεταλλευόμενοι την σωμακλωνική παραλλακτικότητα μια παροδική ή κληρονομούμενη παραλλακτικότητα μεταβολικών διαδικασιών που υποβοηθείται από την διαδικασία της καλλιέργειας *in vitro*.
- Η παραγωγή του κάλου σε καλλιέργεια είναι το πρώτο βήμα για την απόκτηση γενετικά τροποποιημένων κυττάρων ή φυτών π.χ. καλλιεργούμενα φυτά που παράγουν ένα επιθυμητό προϊόν σε μεγαλύτερες ποσότητες.
- Οι πρωτοπλάστες είναι φυτικά κύτταρα των οποίων το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να αφαιρεθεί τεχνητά. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μεταφορείς γονιδίων σε πειράματα και για την δημιουργία υβριδικών κυττάρων, όπως για παράδειγμα κυττάρων που παράγονται από την σύντηξη δύο κυττάρων πρωτοπλαστών και μπορεί να προέρχονται ακόμη κι από εντελώς διαφορετικά είδη.

Από φυτικά είδη που δύσκολα πολλαπλασιάζονται (όπως ο ιξός που πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά με τη βοήθεια των πτηνών) θα μπορούσαν με κλωνικό μικροπολλαπλασιασμό (clonally micropropagated) να παραχθούν χιλιάδες φυτάρια από μια πολύ περιορισμένη κυτταρική μάζα (από ένα και μόνο φυτό). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί από την αναγέννηση φυτού, μέσω οργανογένεσης, παραγωγή βλαστών από ιστοκαλλιέργεια κάλου ή μέσω σωματικής εμβρυογένεσης (διαδικασία σχηματισμού εμβρύου από σωματικούς-σποροφυτικούς ιστούς χωρίς γονιμοποίηση).

Όσο κι αν η ιστοκαλλιέργεια έχει μεγάλες προοπτικές, εδραιωμένα εμπορικά αντικαρκινικά φάρμακα (όπως η *βινβλαστίνη* και *βινκριστίνη* από το *Catharanthus roseus*) ακόμα παράγονται μέσω απομόνωσης από καλλιεργούμενα φυτά. Τελικά, αυτά τα φάρμακα παράγονται ημισυνθετικά από φυσικές πρόδρομες ουσίες που προέρχονται από φυτικές πηγές *in vivo*. Προς το παρόν, υπάρχουν λίγες ουσίες με αντινεοπλαστικές ιδιότητες προερχόμενες από φυτά που παράγονται βιοτεχνολογικά, κυρίως σε εργαστηριακό επίπεδο.

1.7.3. Η Βιοτεχνολογία του *Viscum album* L.

Έως σήμερα δεν είχαν γίνει ιδιαίτερα πειράματα ιστοκαλλιέργειας για το ιξό, π.χ. μεταφορά κυτταρικών ομάδων ή εκφύτων – ιστών από τον ιξό ως αρχικό φυτό και οι υπό- καλλιέργειές τους σε θρεπτικό διάλυμα με αυξητικούς παράγοντες και άλλα συστατικά. Οι *in vitro* τεχνικές είναι μεγάλο πλεονέκτημα στην βιοτεχνολογία φυτών, αφού επιτρέπουν έλεγχο σε αρκετές παραμέτρους που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό της καλλιέργειας. Ερευνητές που δουλεύουν με το *V. album* παγκόσμια, θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τον καθορισμό πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας στα συγκεκριμένα είδη με τους ήδη αναφερθέντες τρόπους.

Η επαγωγή κάλων είναι το πρώτο απαιτούμενο βήμα για την απόκτηση γενετικά συγκεκριμένων τροποποιημένων κυτταρικών σειρών ή φυτών, π.χ. σειρά φυτών με αυξημένη παραγωγή *βισκοτοξίνης* σαν βασική αντίσταση σε παθογόνα, όπως το *Plasmodiophora brassicae* (Holtorf, 1998).

Λόγω της ημι-παρασιτικής φύσης του συγκεκριμένου είδους, είναι πολύ δύσκολο να αναπαραχθεί, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται αποκλειστικά με τη βοήθεια των πουλιών, μεταφέροντας τους σπόρους του (Becker, 1986, Becker, 2000, Grieve, 1994). Η βιοτεχνολογία θα μπορούσε να προσφέρει μια εναλλακτική μέθοδο παραγωγής αξιόλογης ποσότητας βιομάζας του ιξού σ' ένα σχετικά σύντομο χρόνο,

είτε μέσω κυττάρων ή αναπαραγόμενων κάλων, ή μέσω αναπαραγωγής φυτών μέσω οργανογένεσης ή σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Becker και Schwarz (1971) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την πιθανότητα χρήσης της ιστοκαλλιέργειας ιξού σαν μια πηγή βιοενεργών προϊόντων. Για πρώτη φορά αναφέρεται το 1990, από τον Fukui η παραγωγή κάλων από φύλλα του *V. album* var. *lutescens*. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα μισής δύναμης (1/2) MS (Murashige and Skoog 1962) με ρυθμιστές αύξησης α -ναφθυλακετικό οξύ (NAA), μια αυξίνη και κινετίνη (γνωστή κυτοκίνη), για την επαγωγή κάλων.

Οι ερευνητές κατάφεραν να ταυτοποιήσουν στους κάλους 2 γαλακτοζολεκτίνες οι οποίες αρχικά είχαν παρατηρηθεί στα φύλλα του φυτού. Επίσης βρήκαν ότι η επαφή μεταξύ κάλου του ιξού και κάλου του ξενιστή της οξιάς (*Fagus crenata*) δεν κατέληξε σε σχέση παρεμπόδισης για κανένα από τα δύο φυτά. Σκοπός της έρευνάς τους ήταν να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις –αν υπάρχουν- μεταξύ του συγκεκριμένου ξενιστή και του συγκεκριμένου είδους ιξού, σε επίπεδο καλλιέργειας κυττάρων.

Το 1995, αναφέρεται από τον Bajaj η προσπάθεια σωματικής εμβρυογένεσης στο είδος του ιξού *Dendrophthoe falcate* (L.f.) *Ettingsh*. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια εμβρύων από καρπούς που βρίσκονταν σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα σύμφωνα με τον White (1943) και σε διάφορους συνδυασμούς και συγκεντρώσεις των ρυθμιστών αύξησης: ινδολο-ακετυλ-οξέος (IAA) και καζεΐνης (CH). Μελετήθηκε, κυρίως, ο τρόπος ανάπτυξης των εμβρύων στα διάφορα υποστρώματα (απόκριση στα καλλιεργητικά μέσα, σχήμα των εμβρύων, οργανογένεση, σωματική εμβρυογένεση). Παρατηρήθηκε ότι τα νεαρά σφαιρικά και προ σφαιρικά έμβρυα υφίσταται πολλαπλασιασμό στη μορφή του κάλου, ο οποίος τελικά διαφοροποιείται σε πολυεμβρυακές μάζες σωματικών εμβρύων. Τα ώριμα ζυγωτικά έμβρυα, που καλλιεργήθηκαν χωρίς το ενδοσπέρμιο, αναπτύσσονται άμεσα, ενώ τα ώριμα έμβρυα με το ενδοσπέρμιο παρουσιάζουν συνολική καλογένεση του εμβρύου και του ενδοσπερμίου, διαφοροποίηση των οφθαλμών του βλαστού, και σωματικά έμβρυα. Τα νεαρά σωματικά έμβρυα, που προέρχονται από τις πολυεμβρυακές μάζες, όταν καλλιεργηθούν στο ίδιο καλλιεργητικό μέσο, πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν πρόσθετα έμβρυα, ενώ τα ώριμα σωματικά έμβρυα με καλά ανεπτυγμένες κοτυληδόνες υφίστανται βλάστηση.

Ο Langer το 1997, κλωνοποίησε διαφορετικά τμήματα του γονιδίου της πρωτεΐνης ML από το γένωμα του DNA του ιξού, κατασκεύασε την έκφραση των φορέων (A- και B-αλυσίδες κωδικοποιημένες-κρυπτογραφημένες περιοχές) και οι μονές αλυσίδες εκφράστηκαν στο *E. coli* χωριστά. Οι πειραματικές έρευνες στη δραστηριότητα της ανασυνδυασμένης λεκτίνης του ιξού (rML) ήταν ελπιδοφόρες (Mockel, 1997, Beuth, 2000).

Η έως τώρα επιβεβαιωμένη έρευνα με ιστοκαλλιέργεια στο *Viscum album* είναι περιορισμένη σ' ένα μικρό αριθμό μελετών, όμως περαιτέρω πρόοδος στην σωματική εμβρυογένεση και άλλες πλεονεκτικές πλευρές της ιστοκαλλιέργειας θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη χρήση του ιξού ως φαρμακευτικό φυτό, μέσω της βιοτεχνολογίας.

1.8. ΑΛΛΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Υπάρχουν πολλά φυτικά είδη που είναι υποσχόμενα για την εμπορική παρασκευή αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα περισσότερα από αυτά ακόμη παράγονται

με τον παραδοσιακό τρόπο (εκχύλιση από τα φυτά – δότες), ενώ κάποια παράγονται ημισυνθετικά (από φυσικές πρόδρομες ουσίες). Λίγα από αυτά παρασκευάζονται βιοτεχνολογικά, κυρίως σ' εργαστηριακό επίπεδο.

Γνωστά παραδείγματα φυτών από τα οποία προήλθαν φυσικές ουσίες ορόσημο για την θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου με επιτυχή παραγωγή και εμπορική διάθεση, είναι τα ακόλουθα.

Periwinkle (*Catharanthus roseus* or *Vinca rosea*, Οικογένεια: *Apocynaceae*): Η βίνκα η ρόδινη (Madagascar periwinkle) αποτελεί μια σύγχρονη ιστορία επιτυχίας στις έρευνες για φυσικά φάρμακα για την καταπολέμηση του καρκίνου.

Το φυτό χρησιμοποιήθηκε για πολλούς αιώνες για τη θεραπεία του διαβήτη, της υψηλής πίεσης του αίματος, του άσθματος, της δυσκοιλιότητας και των εμμηνορροϊκών προβλημάτων. Όταν ελέγχθηκε μέσα στα πλαίσια επιστημονικών μελετών αποδείχθηκε ότι μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον διαβήτη και στις έρευνες για την αντιμετώπιση του καρκίνου, με μεγάλα οφέλη.

Η απομόνωση των ενεργών ενώσεων από το φυτό της βίνκας ξεκίνησε το 1954 από τον Δρ. Charles T. Beer. Για την παρασκευή του εκχυλίσματος χρειαζόνταν πάρα πολλά φύλλα γι' αυτό αποφασίστηκε η καλλιέργεια του φυτού της βίνκας. Τελικά, απομόνωσε μια μικρή ποσότητα άγνωστου αλκαλοειδούς, το οποίο είχε υψηλή δράση και σημείωσε μια εξαιρετικά σημαντική μείωση του λεμφοκυτταρικού τύπου καθώς και του μυελού των οστών. Το συγκεκριμένο αλκαλοειδές ονομάστηκε *βίνκα-λευκοβλαστίνη* (αργότερα έγινε σύντμηση της ονομασίας αυτής σε *vinblastine* (VBL), ελλ. βινβλαστίνη). Διαπίστωσε με περαιτέρω ανάλυση του φυτού ότι η βίνκα περιέχει πολύ μεγάλη ποικιλία χρήσιμων αλκαλοειδών (70 συνολικά σύμφωνα με την τελευταία μέτρηση). Ορισμένα από τα αλκαλοειδή που απομονώθηκαν, διέθεταν ιδιότητες που μείωναν τα επίπεδα του σακχάρου του αίματος, άλλα και την πίεση του αίματος και κάποια άλλα που ενεργούσαν ως αιμοστατικά. Ένα από αυτά ήταν η *βινκριστίνη* (VCR), αλλά η ποσότητά της δεν ήταν αρκετή για να επιτευχθεί η απομόνωσή της μέσα στο εργαστήριο. Η *βινκριστίνη* απομονώθηκε αργότερα υπό τη μορφή κρυστάλλου από χημικούς της εταιρείας Eli Lilly Co.

Αργότερα, απομονώθηκαν περίπου 100 αλκαλοειδή, αλλά δεν ήταν κατάλληλα για κλινική χρήση. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας αυτής πραγματοποιήθηκε από την αμερικανική φαρμακευτική εταιρεία: Eli Lilly και ο υπεύθυνος ερευνητής ήταν ο Δρ. Gordon H. Svoboda. Η *ινδόλη* του *C. roseus*, η *βινβλαστίνη* και η *βινκριστίνη*, ήταν τα πρώτα προϊόντα του φυτού τα οποία εγκρίθηκαν από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία του καρκίνου στις αρχές του 1970, και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα. Οι ανάγκες παραγωγής του τελικού προϊόντος για ιατρική χρήση είναι υψηλές, χωρίς ικανοποιητική κάλυψη, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης *βινβλαστίνης* και *βινκριστίνης* στην *C. roseus*, παρόλο που καλλιεργείται σε πολλές τροπικές χώρες (Samuelsson, 1992).

Πολλές μελέτες έχουν σταδιακά οδηγήσει στην παραγωγή διαφόρων ινδολικών αλκαλοειδών, από κυτταρικές καλλιέργειες του *C. roseus*. Αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μελετήθηκαν (συμπεριλαμβανομένου του θρεπτικού μέσου, των ρυθμιστών αύξησης του θρεπτικού υποστρώματος, του οσμωτικού στρες, των πρόδρομων ουσιών).

Η *βινβλαστίνη* και η *βινκριστίνη*, που ανήκουν στην ομάδα των αλκαλοειδών της βίνκας, προκαλούν κυτταροτοξικότητα μέσω της άμεσης επαφής με την *τουμπουλίνη*, η οποία αποτελεί τη βασική υπομονάδα πρωτεΐνης των μικροσωληνίσκων και πρόδρομη ουσία για την παραγωγή των . Άλλες βιοχημικές

δράσεις που συσχετίζονται με η *βινβλαστίνη* και η *βινκριστίνη* είναι οι εξής: ανταγωνισμός για μεταφορά των αμινοξέων στα κύτταρα. αναστολή της βιοσύνθεσης της *πουρίνης*, αναστολή του RNA, DNA, και της σύνθεσης της πρωτεΐνης. αναστολή της γλυκόλυσης. αναστολή της απελευθέρωσης *ισταμίνης* από μαστοκύτταρα και ενισχυμένη αποδέσμευση *επινεφρίνης*. Τέλος, διάσπαση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης και των λειτουργιών της μεμβράνης. Οι μικροσωληνίσκοι είναι παρόντες στα ευκαρυωτικά κύτταρα και έχουν ζωτική σημασία για την εκτέλεση πολλών κρίσιμων λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης του σχήματος των κυττάρων, της μίτωσης, της έκκρισης, και της ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Η *βινβλαστίνη* και η *βινκριστίνη* ασκούν την ανασταλτική δράση των μικροσωληνίσκων πραγματοποιώντας πρόσδεση σε ένα σημείο της *τουμπουλίνης*, το οποίο διαφέρει εμφανώς από τα άλλα σημεία πρόσδεσης. Διαθέτουν μια σταθερά σύνδεσης $5,6 \times 10^{-5}$ M και ξεκινούν μια αλληλουχία συμβάντων που οδηγούν σε διάσπαση των μικροσωληνίσκων. Η σύνδεση της *βινβλαστίνης* και *βινκριστίνης* στη *τουμπουλίνη*, αποτρέπει με τη σειρά της, τον πολυμερισμό των εν λόγω υπομονάδων σε μικροσωληνίσκους. Στα καθαρά αποτελέσματα αυτών των διαδικασιών περιλαμβάνεται η παρεμπόδιση του πολυμερισμού της *τουμπουλίνης* σε μικροσωληνίσκους, κάτι που ενδεχομένως να οδηγήσει στην αναστολή των ζωτικών κυτταρικών διεργασιών και στο θάνατο του κυττάρου. Παρόλο που από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η μιτωτική αναστολή είναι η κύρια κυτταροτοξική επίδραση των αλκαλοειδών, υπάρχουν ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες τα καταστροφικά αποτελέσματα αυτών των παραγόντων μπορούν να αποδοθούν εν μέρει στην επίδραση σε άλλες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα αλκαλοειδή εμφανίζονται επίσης ως κυτταροτοξικά σε κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε αμφοτέρες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου G1 και S. Με άλλα λόγια, η *βινβλαστίνη* και η *βινκριστίνη* λειτουργούν αναστέλλοντας τη μίτωση στη μετάφαση (Danieli, 1998, Garnier, 1996).

Pacific Yew (*Taxus brevifolia*, *Taxus baccata*, Οικογένεια: *Taxaceae*): Το έλατο του Ειρηνικού, όπως είναι γνωστό, αποτέλεσε ορόσημο για την παραγωγή της ταξόλης. Η σημαντική όμως κλινική της αποτελεσματικότητα οδήγησε στην κρίση στην παροχή του φαρμάκου, αφού δεν υπήρχαν επαρκείς ποσότητες. Ως αποτέλεσμα, το NCI (Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο) ανέπτυξε σχέδια για την αποφυγή παρόμοιων κρίσεων στο μέλλον, ξεκινώντας ερευνητικά προγράμματα για παραγωγή μεγάλης κλίμακας.

Η ιστορία ξεκίνησε το 1958, όταν το Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο (NCI) των ΗΠΑ ξεκίνησε ένα πρόγραμμα για να μελετήσει 35.000 είδη φυτών όσον αφορά την αντικαρκινική τους δραστηριότητα. Το 1963, οι Δρ. Monroe Wall και M.C. Wani του Research Triangle Institute, της Βόρειας Καρολίνας, ανακάλυψαν ότι ένα εκχύλισμα από το φλοιό του δέντρου Pacific yew έχει αντικαρκινική δραστηριότητα (Cragg, 1998). Η χρήση του *Taxus* στη θεραπεία του καρκίνου, ξεκίνησε σχεδόν αμέσως αφού γρήγορα παρασκευάστηκε από το εκχύλισμά του ένα φάρμακο κατά του καρκίνου το οποίο ονομάστηκε *ταξόλη-Taxol*- (περιέχει την ουσία *paclitaxel*). Προσφάτως, εγκρίθηκε και από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων για χρήση κατά του καρκίνου των ωοθηκών ενώ παράλληλα έχει επιδείξει δραστηριότητα κατά του καρκίνου του μαστού, των πνευμόνων και άλλων τύπων καρκίνου. Το εν λόγω φάρμακο εγκρίθηκε επίσης στην Πολωνία το 1996.

Οι δοκιμές σε ανθρώπους ξεκίνησαν το 1983. Παρά ορισμένους θανάτους από απρόβλεπτες αλλεργικές αντιδράσεις που οφείλονταν στη μορφή υπό την οποία χορηγήθηκε το φάρμακο, πολλές ήταν οι θετικές ενδείξεις σε γυναίκες οι οποίες έπασχαν από ανίατο καρκίνο των ωοθηκών. Αυτό οδήγησε το NCI να συνάψει μια

σύμβαση με την Bristol Myers-Squibb (BMS), μια φαρμακευτική εταιρεία που διατηρούσε την έδρα της στις Ηνωμένες Πολιτείες, για την κλινική ανάπτυξη της ταξόλης (Rowinsky, 1990).

Η έρευνα πάνω στην εξεύρεση εναλλακτικών μορφών της ταξόλης από το φλοιό του δέντρου Pacific yew, είναι αδιάλειπτη. Η ταξόλη έχει παρασκευασθεί χημικά, ενώ έχουν αναπτυχθεί ημι-συνθετικές μέθοδοι με τη χρήση βελόνων και κλαδιών από άλλα είδη του ίδιου δέντρου τα οποία αναπτύσσονται σε γεωργικά περιβάλλοντα. Αυτό μειώνει την πίεση πάνω στις φυσικές θέσεις του Pacific Yew αλλά ο φλοιός εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για παραγωγή ταξόλης (Cragg, 1993).

Έρευνες διεξάγονται πάνω στην επίδραση της ταξόλης στον καρκίνο των ωοθηκών, του στήθους, του εντέρου και τον γαστρικό καρκίνο, την αρθρίτιδα, τη νόσο Alzheimer, ως βοηθήματος σε ασθένειες της στεφανιαίας αρτηρίας και σε ασθένειες της καρδιάς καθώς και ως παράγοντας κατά των ιών. Κάθε χρήση του φυτού υπό οποιαδήποτε μορφή για κάθε ιατρικό λόγο ή λόγο υγείας θα πρέπει να γίνεται μόνο κατόπιν συμβουλής από τον θεράποντα ιατρό.

Το Taxotere είναι ανάλογο της ταξόλης, το οποίο έχει μεγάλες δυνατότητες και έχει παρασκευασθεί συνθετικά. Προωθεί τη συγκρότηση και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων με δραστηριότητα σχεδόν διπλάσια από αυτή της ταξόλης. Προσφάτως, η ταξόλη και το taxotere αποδείχθηκε πως είναι κατάλληλα για το ίδιο σημείο σύνδεσης. Ενώ το μεγαλύτερο μέρος της δράσης του taxotere αντικατοπτρίζει εκείνη της ταξόλης, εμφανίζεται ότι οι μικροσωληνίσκοι που έχουν δημιουργηθεί από επαγωγή του taxotere διαφέρουν δομικά από εκείνους που έχουν δημιουργηθεί από επαγωγή της ταξόλης. Το Taxotere παράγεται επί του παρόντος με τη σύνδεση μιας συνθετικής πλευρικής αλυσίδας σε 10-deacetyl baccatin III, από το Ευρωπαϊκό είδος *T. baccata*, με αποδόσεις που προσεγγίζουν το 1 kg από 3.000 kg βελόνες (Hirasuna, 1996). Η κυτταρική καλλιέργεια έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ταξόλης σημασμένης με ^{14}C από ^{14}C οξικού νατρίου. Το USDA (Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών) έχει λάβει μια ευρεσιτεχνία για την παραγωγή ταξόλης από καλλιεργημένα κύτταρα κάλλου του *T. brevifolia*. Το Υπουργείο εκχώρησε άδεια για τη διεργασία αυτή στη Phyton Catalytic, που εκτιμά ότι σύντομα θα αρχίσει η εμπορική παραγωγή. Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου συστήματος είναι ότι το σημαντικότερο προϊόν έκκρισης των κυττάρων είναι η ταξόλη, που μειώνει την κάθαρση στην εκχύλιση αιθέρα από το μέσο. Η ESCA genetics ανακοίνωσε επίσης μια τεχνολογία για την παραγωγή υψηλών επιπέδων ταξόλης σε κυτταρικές καλλιέργειες φυτών, και σχεδιάζουν μια μεγάλης κλίμακας παραγωγή στο εγγύς μέλλον. Επιπλέον, οι καλλιέργειες κάλλου του *T. cuspidata* και *T. canadensis* διατηρήθηκαν σε ένα σύστημα παραγωγής ταξόλης για περισσότερους από δύο μήνες. Ένας μύκητας συγγενής ως προς το *T. brevifolia*, που παράγει μικρές ποσότητες ταξόλης απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε από τον Helfferich (1993).

Camptotheca (*Camptotheca acuminata*, **Οικογένεια: Nyssaceae**): Κατά την διάρκεια του προγράμματος του NCI στα τέλη της δεκαετίας του '50 (πρόγραμμα μελέτης φυτικών ειδών για την αντικαρκινική τους δράση), βρέθηκε ότι ένα παράγωγο από το φυτό *Camptotheca acuminata* είχε αντικαρκινικές ιδιότητες. Ο Dr Wall και άλλοι ερευνητές από το [Research Triangle Institute](#), το 1966, απομόνωσαν από τον φλοιό ένα νέο αλκαλοειδές, την καπτοθεκίνη (*camptothecin* - CPT) (Duke, 1985). Παρόλο που μελέτες στα ζώα είχαν επιβεβαιώσει τις αντικαρκινικές της ιδιότητες, οι κλινικές μελέτες ακυρώθηκαν λόγω υψηλής τοξικότητας και πολλών ανεπιθύμητων ενεργειών. Μόλις το 1985 ανανεώθηκε το ενδιαφέρον ξανά, αφού βρέθηκε ότι η καπτοθεκίνη παρεμποδίζει την τοποϊσομεράση I (*topoisomerase I*) και κατά συνέπεια το διπλασιασμό του DNA οπότε και εξελίχθηκε σ' ένα νέο

αντικαρκινικό φάρμακο. Λόγω της υψηλής του τοξικότητας, οι ερευνητές ανέπτυξαν αρκετά ημισυνθετικά παράγωγα, τα οποία είχαν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Αυτό βοήθησε να γίνουν οι *καπτοθεκίνες (CPTs)* η δεύτερη σημαντικότερη πηγή αντικαρκινικών φαρμάκων.

Τρία ημισυνθετικά φάρμακα από *CPT* έχουν εγκριθεί από το FDA:

- 1) *topotecan*, ως θεραπεία σε προχωρημένο καρκίνο ωοθηκών (εγκρίθηκε το Μάιο του 1996) και παράγεται από την Smith Kline Beecham Pharmaceuticals με την εμπορική ονομασία *Hycamtin*.
- 2) *irinotecan HCl*, σ' ενέσιμη μορφή, ως θεραπεία σε μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (εγκρίθηκε το Ιούνιο του 1996). Δίνεται συνήθως εφόσον δεν υπάρχει ανταπόκριση στις συνήθεις χημειοθεραπείες. Προωθείται από την Pharmacia & Upjohn (τώρα Pfizer), υπό την εμπορική ονομασία *Camptosar*.
- 3) *9-nitro camptothecin*, ως θεραπεία για τον καρκίνο του παγκρέατος. Είναι γνωστό με την εμπορική ονομασία *Rubitecan*.

Υπάρχουν και άλλες *CPTs* που χρησιμοποιούνται σε κλινικές μελέτες για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου, του μελανώματος, του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, της λευχαιμίας, αλλά και του HIV.

Παρ' όλο που πολλές επιτυχημένες προσπάθειες έχουν γίνει για την χημική σύνθεση της *CPT*, η κύρια πηγή της ουσίας προέχεται από την φυσική οδό, λόγω του υψηλού κόστους αυτών (Cyperbotanica: Plants used in cancer treatment). Ακριβώς επειδή όλη η παραγωγή βασίζεται στο φυτό *Camptotheca acuminata*, έχει θεωρηθεί προστατευόμενο είδος και απαγορεύεται η εξαγωγή σπόρων της. Στις Ηνωμένες Πολιτείες (Η.Π.Α.) έχει γίνει με επιτυχία η καλλιέργεια του είδους, όμως φαίνεται ότι η απόδοση του καλλιεργούμενου φυτού σε *CPT* είναι χαμηλότερη απ' ότι σε αυτό που εκφύεται στην Κίνα.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός της μελέτης

Η αναπαραγωγή του ιξού είναι πολύ δύσκολη, λόγω της ημι-παρασιτικής φύσης του φυτού. Αν και υπάρχει επάρκεια φυσικού προϊόντος, οι ιδιότητες των εκχυλισμάτων εξαρτώνται άμεσα από τις διαδικασίες παραγωγής, τον ξενιστή και την περίοδο συγκομιδής. Επειδή η σταθερότητα του προϊόντος (παραγωγή συγκεκριμένου ποιοτικά αλλά και ποσοτικά προϊόντος) είναι πολύ βασικό θέμα (Wagner, 1986), θα μπορούσε να λυθεί με την ιστοκαλλιεργητική παραγωγή κάλων ιξού και την προετοιμασία εκχυλισμάτων από αυτούς με συγκεκριμένα πρωτόκολλα.

Στην παρούσα μελέτη έγιναν πειράματα με σκοπό την διευκρίνιση και τον προσδιορισμό των συνθηκών κάτω από τις οποίες η ιστοκαλλιέργεια του ιξού μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό (καθορισμός πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας). Μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών φυτικών μερών, του χειρισμού των εκφύτων, των ρυθμιστών αύξησης και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος. Μέχρι την πραγματοποίηση της παρούσης μελέτης, δεν υπήρχαν ιδιαίτερα εστιασμένα πειράματα σε αυτήν την κατεύθυνση. Οι Becker & Schwarz (1971) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την πιθανότητα χρήσης των κάλων του ιξού ως πηγή βιοενεργών προϊόντων. Το 1990 ο Fukui και οι συνεργάτες του ανέφεραν την πρώτη παραγωγή κάλων από φύλλα του είδους *V. album* var. *lutescens* στους οποίους διέκριναν 2 λεκτίνες με ικανότητα σύνδεσης γαλακτόζης, όμοιες με αυτές που υπάρχουν στα φύλλα του φυτού. Επίσης διαπίστωσαν ότι η επαφή μεταξύ κάλου του ιξού και κάλου από το φυτό ξενιστή-οξιά (*Fagus crenata*) δεν κατέληξαν σε επαφή παρεμπόδισης ή αλληλεπίδρασης για κανένα από τα δύο είδη. Η μελέτη τους αυτή εστιάστηκε περισσότερο στη διαπίστωση της παραγωγής ή όχι ουσιών όμοιων με το φυτό από τους κάλους κι όχι τόσο στην καταγραφή και τεκμηρίωση ιστοκαλλιεργητικών πρωτοκόλλων, που θα βοηθήσουν στη συνεχή παραγωγή προϊόντος, ανεξάρτητα από τους παράγοντες που επηρεάζουν αυτήν σήμερα.

Παρ' όλο που η επιβεβαιωμένη έρευνα με ιστοκαλλιέργεια στο *Viscum album* είναι περιορισμένη σ' ένα πολύ μικρό αριθμό μελετών, η επιτυχής επαγωγή κάλων και σωματικών εμβρύων από αυτό το είδος επιτρέπει μια ευδιάκριτη δυναμική για την εφαρμογή της μεθόδου να διευκολύνει την *in vitro* παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών. Περαιτέρω πρόοδος στην σωματική εμβρυογένεση και άλλες πλεονεκτικές πλευρές της ιστοκαλλιέργειας (π.χ. καλλιέργεια πρωτοπλαστών και σύντηξη, δημιουργία τετραπλοειδών σειρών) θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντική ανάμιξη της βιοτεχνολογίας στη χρήση του ιξού σαν φαρμακευτικό φυτό – είδος.

Παράλληλα με την αναζήτηση σταθερού ποιοτικά και ποσοτικά προϊόντος από το συγκεκριμένο φυτό, η αναζήτηση μεθόδων ή εκχυλισμάτων που θα καθιστούν το προϊόν μη τοξικό είναι εξίσου σημαντική, αφού οι ανεπιθύμητες ενέργειες, κατά την εφαρμογή του στην ιατρική, θα μπορούσαν να ελαχιστοποιηθούν και να οδηγήσουν στην ευρεία εξάπλωσή του ως θεραπεία, διατηρώντας τα θετικά οφέλη που προκύπτουν από αυτήν και βελτιώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα προαναφερθέντα, οι κύριοι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν οι εξής:

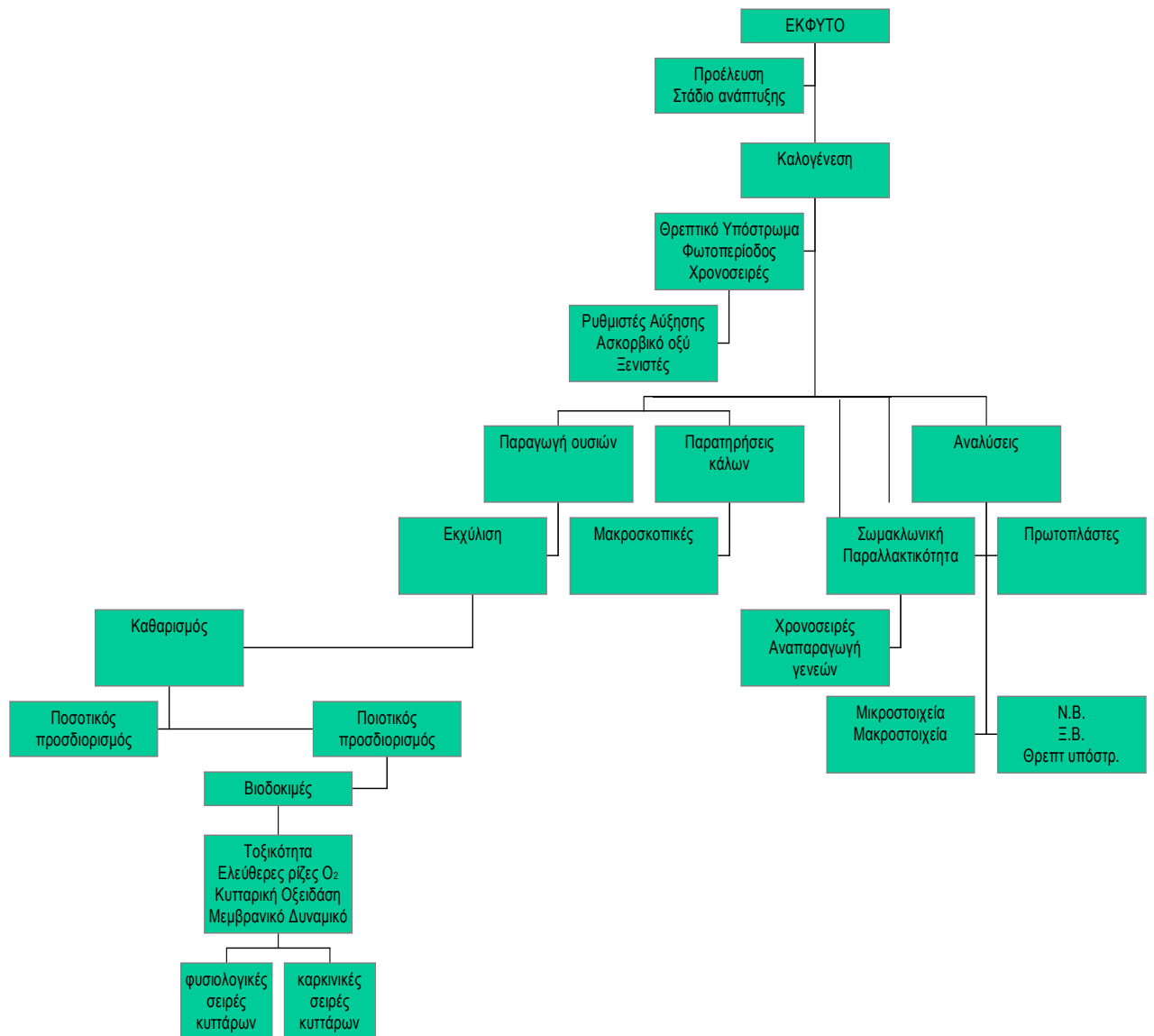
1. Η δημιουργία βέλτιστου πρωτοκόλλου εγκατάστασης καλλιεργείων κάλου από το *V. album* και η παράλληλη διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν αυτήν.

2. Η μελέτη της συσσώρευσης ανόργανων μάκρο- και μικροστοιχείων κατά την *in vitro* καλλιέργεια διαφορετικών εκφύτων του *V. album*.
3. Η μελέτη της παραγωγής κύριων πρωτεϊνών από τις κυτταροκαλλιέργειες του *V. album*.
4. Η πρόκληση σωμακλωνικής παραλλακτικότητας με στόχο την *in vitro* παραγωγή νέων πρωτεϊνών.
5. Η μελέτη της κυτταροτοξικής (και ιδιαίτερα αντικαρκινικής) δράσης των νέων πρωτεϊνών.

Για την υλοποίηση των παραπάνω στόχων καταστρώθηκε ένα πειραματικό σχέδιο, το οποίο περιγράφεται συνοπτικά στο επόμενο Σχήμα 1.

Σχήμα 1.

Διάγραμμα σταδίων εργασίας



3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Προκειμένου να καθοριστούν οι άριστες συνθήκες για την ιστοκαλλιέργεια του ιξού (*Viscum album*), μελετήθηκαν τα αποτελέσματα επαγωγής κάλου με βάση διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του φυτού, την παραγωγή ουσιών από αυτό και την καλογένεση. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επαγωγή κάλου σε διάφορα φυτικά μέρη (άνθη, βλαστοί, φύλλα, έμβρυα), σε διαφορετικές εποχές συγκομιδής, (χειμώνας, καλοκαίρι), με διάφορες μεθόδους απολύμανσης του εκφύτου, ρυθμιστές αύξησης και καλλιεργητικά μέσα. Ελέγχθηκε ποια είναι η καλύτερη περίοδος συγκομιδής με βάση την ανταπόκριση των εκφύτων στις καλλιεργητικές συνθήκες και την μεγαλύτερη συγκέντρωση φρέσκου κάλου, καθώς και το ποσοστό ανάπτυξης των κάλων. Διαπιστώθηκε αν η προσθήκη ασκορβικού οξέος βελτίωσε ή όχι την παραγωγή κάλων και την ανάπτυξή τους. Έγινε προσθήκη στο βασικό υπόστρωμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις ολιγοσακχαριτών για να διερευνηθεί η επίδραση αυτών στην ανάπτυξη του εκφύτου και την σωματική εμβρυογένεση.

Είναι πιθανόν η χρήση καλλιεργητικών μέσων, όπως το MS, που περιέχει διάφορα άλατα σε υψηλές συγκεντρώσεις να είναι προτιμητέα για την ιστοκαλλιέργεια του ιξού, ο παρασιτισμός του οποίου παρουσιάζει ειδική προσαρμογή στην ανόργανη θρέψη (Becker, 1986, Grieve, 1994).

Ακόμη, με ηλεκτροφορετική ανάλυση των παραγόμενων πρωτεϊνών από έκφυτα βλαστών-φύλλων και από τους αντίστοιχους κάλους αποδείχθηκε η σχέση ή όχι μεταξύ τους (σχέση του πρότυπου με το φυτό δότη).

Συνολικά, έγινε προσπάθεια να επιτευχθούν και να καταγραφούν οι καλύτερες συνθήκες για την επαγωγή κάλου από το φυτό *V. album*, μελετώντας όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή του και την παραγωγή ουσιών ωφέλιμων για τον άνθρωπο. Επίσης έγινε σύγκριση των παραγόμενων από το φυτό ουσιών, που τεκμηριωμένα χρησιμοποιούνται στην ιατρική, με αυτές που παράχθηκαν βιοτεχνολογικά, με τη βοήθεια της ιστοκαλλιέργειας.

3.1.1. Φυτικό υλικό - Έκφυτο

Ο λευκός ιξός (*Viscum album* L.) της οικ. Loranthaceae, είναι φυτό ημιπαρασιτικό αειθαλές φυόμενο στα κλαδιά 452 διαφορετικών ειδών-ξενιστών, σε 96 γένη 44 οικογενειών όπως *Salix*, *Populus*, *Acer*, *Malus*, *Crataegus*, *Prunus*, *Abies* και *Pinus*, ξεπερνώντας συνεπώς τον Ινδικό – Νότιο-ανατολικό-ασιατικό ιξό (*Dendrophthoe falcata* L. f.) (401 είδη-ξενιστές) (Barney, et al., 1998).

Χρησιμοποιήθηκαν ανθισμένα και μη ανθισμένα φυτά ιξού (*Viscum album* L.) της ποικιλίας *abietis*, μία από τις τρεις βασικές ποικιλίες του ιξού, που μεγαλώνει σε έλατα του όρους Πάρνηθα (Αττική). Τα φυτά ταξινομήθηκαν ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής τους σε «χειμερινά» (όταν συλλέγονταν από Δεκέμβριο έως Μάρτιο) ή «καλοκαιρινά» (όταν η περίοδος συγκομιδής τους ήταν από Απρίλιο έως Νοέμβριο). Τα συλλεχθέντα φυτά διατηρήθηκαν στους 4° C πριν αφαιρεθούν τα διάφορα μέρη του φυτού (φύλλα, βλαστοί) για την εμφύτευση.

Οι ανθήρες συλλέχθηκαν από Μάρτιο έως Μάιο, που είναι και η περίοδος άνθησης του φυτού.

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν για την εμφύτευση, συλλέχθηκαν από Δεκέμβριο έως Φεβρουάριο και βρίσκονταν στο στάδιο που περιείχαν προ-έμβρυα ή έμβρυα.

3.1.2. Ασηπτικό Περιβάλλον

3.1.2.1. Αποστείρωση

Η αποστείρωση περιλαμβάνει την αποστείρωση όλων των θρεπτικών υλικών καθώς και όλων των σκευών καλλιέργειας. Πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο (autoclave) στους 121°C και σε πίεση 15-20 psi (1,2 atm). Ο χρόνος αποστείρωσης ήταν στα 20 λεπτά της ώρας (Torres, 1989). Τα σκεύη καλλιέργειας στη συνέχεια, αποστειρώθηκαν και με υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) για 30 λεπτά. Οι θερμοευαίσθητες ουσίες, όπως είναι οι ορμόνες, προστέθηκαν στο υπόστρωμα καλλιέργειας με ειδικό βιολογικό φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,22-0,45 μm.

Οι εμφυτεύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, εντός ειδικού θαλάμου νηματικής ροής (Laminar air flow cabinet).

3.1.2.2. Απολύμανση εκφύτων (φύλλων και βλαστών)

Κανένα έως τώρα τεκμηριωμένο πρωτόκολλο δεν ήταν γνωστό για την απολύμανση εκφύτων από το φυτό του ιξού, γι' αυτό δοκιμάστηκαν διάφορα γνωστά πρωτόκολλα απολύμανσης από άλλα φυτά, όπως και συνδυασμοί αυτών για να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Οι βλαστοί και τα φύλλα, που προορίζονταν για εμφύτευση, απολυμάνθηκαν είτε με (i) 1% (β/ο) υποχλωριώδες νάτριο για 15 λεπτά, ή (ii) 0.1% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά, ή (iii) 0.1% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 20-25 λεπτά ή (iv) 1% (β/ο) υποχλωριώδες νάτριο για 15 λεπτά κι ακολούθησε απολύμανση και με 0.01% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά. (v) 10% υποχλωριώδες ασβέστιο κοινώς χλωρίνη (CaCl₂) για 15 λεπτά κι ακολούθησε απολύμανση και με 0.01% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά, (vi) 10% υποχλωριώδες ασβέστιο κοινώς χλωρίνη (CaCl₂) για 10 λεπτά κι ακολούθησε απολύμανση και με 0.01% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά, (vii) 10% υποχλωριώδες ασβέστιο κοινώς χλωρίνη (CaCl₂) για 15 λεπτά κι ακολούθησε απολύμανση και με 0.01% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 20-25 λεπτά. Σε όλες τις περιπτώσεις τα διαλύματα περιείχαν 2% (ο/ο) Tween-80. Τα απολυμασμένα έκφυτα τελικά ξεπλένονταν τέσσερις φορές με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, εντός του θαλάμου νηματικής ροής, και τα αποστειρωμένα έκφυτα κόβονταν σε τεμάχια μήκους 0.5 cm, όταν πρόκειται για φύλλα και 1 cm, όταν πρόκειται για βλαστούς, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο θρεπτικό υπόστρωμα (τα φύλλα με το κάτω μέρος τους να ακουμπά το θρεπτικό υπόστρωμα).

Για κάθε πρωτόκολλο απολύμανσης καλλιεργήθηκαν 25 τρυβλία με τέσσερα έκφυτα το καθένα (σύνολο 100 έκφυτα) και έγινε μία επανάληψη (σύνολο 200 έκφυτα).

Οι ίδιες δοκιμές πρωτοκόλλων απολύμανσης κι επαναλήψεις ακολούθησαν για όλα τα υποστρώματα με τους διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης, με και χωρίς ασκορβικό οξύ.

Στον Πίνακα 2. περιγράφονται οι τεχνικές απολύμανσης που χρησιμοποιήθηκαν για τα έκφυτα (φύλλα και βλαστοί).

Πίνακας 2. Τεχνικές απολύμανσης που εφαρμόστηκαν ανά υπόστρωμα

Τεχνικές Απολύμανσης	
	Είδος Υποστρώματος
10% CaCl₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (12 min)	NAA 1 mg/lit
	KIN 1 mg/lit
	2,4-D 2 mg/lit
	NAA: KIN 1 mg/lit
	KIN: 2,4-D 1:2 mg/lit
10% CaCl₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (12 min)	10% Ασκορβικό οξύ
	NAA 1 mg/lit
	KIN 1 mg/lit
	2,4-D 2 mg/lit
	NAA: KIN 1 mg/lit
10% CaCl₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (12 min)	NAA 1 mg/lit
	KIN 1 mg/lit
	2,4-D 2 mg/lit
	NAA: KIN 1 mg/lit
	KIN: 2,4-D 1:2 mg/lit
10% CaCl₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (20-25 min)	20% Ασκορβικό οξύ
	NAA 1 mg/lit
	KIN 1 mg/lit
	2,4-D 2 mg/lit
	NAA: KIN 1 mg/lit
	KIN: 2,4-D 1:2 mg/lit

Σε μερικά από τα πρωτόκολλα απολύμανσης, τα έκφυτα από φύλλα και βλαστούς του ιξού, δεν ανταποκρίθηκαν (*i*) 1% (β/ο) υποχλωριώδες Νάτριο για 15 λεπτά, *ii*) 0.1% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά, *iv*) 1% (β/ο) υποχλωριώδες Νάτριο για 15 λεπτά κι ακολούθησε απολύμανση και με 0.01% (β/ο) χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά) ή παρουσίασαν νεκρώσεις στις άκρες τους (0,1% *χλωριούχο υδράργυρο* για 20-25 λεπτά).

3.1.2.3. Προμεταχείριση άλλων εκφύτων (ανθέρων και καρπών)

Ανθήρες: Φύλαξη στο ψυγείο στους 4° C. Τοποθέτησή τους σε τρυβλία με νερό (πρόκληση αφυδάτωσης) για χρονικό διάστημα τριών ημερών, μίας εβδομάδας και 2 εβδομάδων.

Καρποί: Τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν από τους καρπούς κι απολυμάνθηκαν με 90% αλκοόλη και στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, αφαιρέθηκε το κολλώδες εξωτερικό περίβλημα με φλόγα. Ο διαχωρισμός

τους από τον καρπό έγινε κάτω από το μικροσκόπιο, υπό ασηπτικές πάντα συνθήκες (Bajaj, 1995).

3.1.3. Συνθήκες ανάπτυξης

Μετά την εμφύτευση οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης (growth room), όπου τα έκφυτα επωάστηκαν στους 25°C κάτω από πυκνότητα φωτοσυνθετικής ροής (photosynthetic photon flux density – PPF) των 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από 16/8 ώρες φωτοπερίοδο, σε φθορίζουσες λάμπες ψυχρού λευκού φωτός, έντασης 5.000 Lux.

Φύλλα: εφαρμόστηκαν οι παραπάνω συνθήκες.

Βλαστοί: εφαρμόστηκαν οι παραπάνω συνθήκες.

Ανθήρες: εφαρμόστηκαν οι παραπάνω συνθήκες.

Καρποί: φωτισμός έντασης 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 25°C, υγρασία 55-65%.

3.1.4. Εμφυτεύσεις – Είδος Εκφύτου

Επαγωγή κάλου (φύλλα, βλαστοί): τα τεμαχισμένα έκφυτα εμφυτεύτηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (Murashige and Skoog, 1962) βασικό θρεπτικό μέσο με 3% (β/ο) σουκρόζη σε παραγοντικούς συνδυασμούς με διαφορετικούς ρυθμιστές αύξησης (PGRs) [2,4-διγλωροφαινοξυακετικό οξύ (2,4-D), α-ναφθαλικό οξύ NAA), 6-βενζυλαδενίνη (BA) and κινετίνη (Kin)] μόνους ή σε μεταξύ τους συνδυασμούς σε διάφορες συγκεντρώσεις (1.4 - 46.5 μM) και στερεοποίηση με 0.8% άγαρ. Τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν ρυθμισμένα σε pH 5.8 με τη βοήθεια 1N NaOH ή 1N HCl, αποστειρωμένα σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 λεπτά και έγινε έγχυσή τους σε τρυβλία Petri των 100x20 mm (30 ml θρεπτικού μέσου/τρυβλίο, 4 έκφυτα/τρυβλίο). Σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα εμφυτεύτηκαν 500 έκφυτα φύλλων ή βλαστών. Τα εμφυτευμένα τρυβλία κλείστηκαν με Parafilm™.

Σε άλλο, ξεχωριστό πείραμα μελετήθηκε η επίδραση του ασκορβικού οξέος στην νέκρωση ή επιβίωση του εκφύτου, στην παραγωγή κάλου και στην μορφογένεση αυτού, εμφυτεύοντας έκφυτα σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με ή χωρίς ασκορβικό οξύ (10 mg L^{-1}) και 3% (β/ο) σουκρόζη σε πέντε διαφορετικούς συνδυασμούς PGR (Πίνακας 3). Συνολικά 200 έκφυτα φύλλων και 200 βλαστών εμφυτεύτηκαν σε κάθε συνδυασμό.

Ανθήρες: Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υποστρώματα:

Υπόστρωμα 1: όχι ορμόνες, όχι σακχαρόζη, +20 γρ. μαλτόζη. Διάλυμα μακροστοιχείων 1/2 MS.

Υπόστρωμα 2: πλήρες υπόστρωμα MS + κινετίνη (Kin) 1 mg/l

Υπόστρωμα 3: πλήρες υπόστρωμα MS + NAA: Kin =1:1 στην ποσότητα του 1 mg/l.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν συναφή πειράματα στην μία εβδομάδα αφυδάτωσης των ανθέων με τις εξής προσθήκες ρυθμιστών αύξησης: 2,4-D 1 mg/l, BA 1 mg/l, NAA 1 mg/l, NAA: BA =1:1 στην ποσότητα του 1 mg/l. Επανάληψη αυτών των υποστρωμάτων έγινε με την προσθήκη ασκορβικού οξέος στην ποσότητα του 0,1 mg/l σε κάθε ένα από τα παραπάνω υποστρώματα.

Καρποί: Τα έμβρυα και προ έμβρυα καλλιεργήθηκαν σε MS υπόστρωμα με την προσθήκη IAA, καζεΐνης (casein hydrolysate-CH) και νερού καρύδας (coconut water) (Bajaj, 1995). Συγκεκριμένα, στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα (pH 5,6-5,8) προστέθηκε 1 mg/l IAA, 1.000 mg/l καζεΐνη και νερό καρύδας 10%, το οποίο προστίθεται μετά την αποστείρωση, με φίλτρο, κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

Πίνακας 3. : Επεμβάσεις ανά έκφυτο

Είδος εκφύτου	Υπόστρωμα
Φύλλα-Βλαστοί	NAA 0,5 mg/l
	NAA 1 mg/l
	NAA 2 mg/l
	NAA 5 mg/l
	2,4-D 2 mg/l
	KIN 0,5 mg/l
	KIN 1 mg/l
	KIN 2 mg/l
	KIN 5 mg/l
	BA 1 mg/l
Φύλλα-Βλαστοί	NAA:KIN 1:0,5 mg/l
	NAA:KIN 1:1 mg/l
	NAA:KIN 1:2 mg/l
	NAA:KIN 1:5 mg/l
	NAA:KIN 1:10 mg/l
	2,4-D:KIN 2:1 mg/l
	NAA:BA 1:0,5 mg/l
	NAA: BA 1:1 mg/l
	NAA: BA 1:2 mg/l
	NAA: BA 1:5 mg/l
	NAA: BA 1:10 mg/l
Φύλλα-Βλαστοί	+ 10% Ασκορβικό οξύ
	NAA 1 mg/l
	KIN 1 mg/l
	2,4-D 2 mg/l
	NAA:KIN 1:1 mg/l
	2,4-D:KIN 2:1 mg/l

Φύλλα-Βλαστοί	+ 20% Ασκορβικό οξύ
	NAA 1 mg/lt
	KIN 1 mg/lt
	2,4-D 2 mg/lt
	NAA:KIN 1:1 mg/lt
	2,4-D:KIN 2:1 mg/lt
Ανθήρες	Μαλτόζη 20g/lt + Διάλυμα μακροστοιχείων ½ MS
	NAA 1 mg/lt
	2,4-D 1 mg/lt
	KIN 1 mg/lt
	BA 1 mg/lt
	NAA:KIN 1:1 mg/lt
	NAA: BA 1:1 mg/lt
	+ Ασκορβικό οξύ 0,1 mg/lt
	NAA 1 mg/lt
	2,4-D 1 mg/lt
	KIN 1 mg/lt
	BA 1 mg/lt
	NAA:KIN 1:1 mg/lt
	NAA: BA 1:1 mg/lt
Έμβρυα / Προ έμβρυα	IAA 1 mg/lt + καζεΐνη + cw

3.1.7. Εμφυτεύσεις-Περίοδος ανάπτυξης φυτού

Έχει παρατηρηθεί ότι τα εκχυλίσματα ιζού διαφέρουν ανάλογα με την περίοδο συλλογής του φυτού. (Pfüller 2000) Γι' αυτό και τα φυτά ταξινομήθηκαν ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής τους σε «χειμερινά» (όταν συλλέγονταν από Δεκέμβριο έως Μάρτιο) ή «καλοκαιρινά» (όταν η περίοδος συγκομιδής τους ήταν από Απρίλιο έως Νοέμβριο).

Για τα πειράματα με έκφυτα χειμερινής περιόδου χρησιμοποιήθηκαν φύλλα και βλαστοί οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, με την προσθήκη των εξής ρυθμιστών αύξησης: 1 mg/lt NAA, 1 mg/lt Kin, 2 mg/lt 2,4-D, 1 mg/lt BA, συνδυασμός 1:1 NAA:Kin (1 mg/lt) και 1:2 NAA:2,4-D (1 mg/lt Kin, 2 mg/lt 2,4-D). Καλλιεργήθηκαν 25 τρυβλία από κάθε υπόστρωμα με τέσσερα έκφυτα το κάθε ένα (σύνολο 100 έκφυτα ανά υπόστρωμα και είδος εκφύτου). Τα τεμαχισμένα έκφυτα εμφυτεύτηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS) βασικό θρεπτικό μέσο με 3% (β/ο) σουκρόζη και η στερεοποίηση έγινε με 0.8% agar. Τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν ρυθμισμένα σε pH 5.8 με τη βοήθεια 1N NaOH ή 1N HCl, αποστειρωμένα σε autoclaved στους 121°C για 20 λεπτά και έγινε έγχυσή τους σε τρυβλία Petri των 100x20 mm (30 ml θρεπτικού μέσου/τρυβλίο, 4 έκφυτα/τρυβλίο). Τα εμφυτευμένα τρυβλία κλείστηκαν με Parafilm™.

Τα έκφυτα απολυμάνθηκαν επιφανειακά για 15 λεπτά σε υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 10% (β/ο) στο οποίο είχαν προστεθεί 1-2 σταγόνες Tween κι έγινε μία επιπλέον απολύμανση με χλωριούχο υδράργυρο 0.1% (β/ο) για 12 λεπτά. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, στο θάλαμο νηματικής ροής ξεπλύθηκαν πέντε φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, τεμαχίστηκαν σε κομμάτια μήκους 1.5 εκατοστών και εμφυτεύτηκαν στα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα. Η επώαση

των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε κάτω από κάτω από PPFD των 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ σε θερμοκρασία 25 βαθμών Κελσίου και με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως- 8 ώρες σκοτάδι.

Οι ίδιες εμφυτεύσεις επαναλήφθηκαν για τα ίδια υποστρώματα και υπό τις ίδιες συνθήκες, με την προσθήκη 10% (β/ο) ασκορβικού οξέος.

Στους πίνακες 4 και 5 περιγράφονται τα είδη των υποστρωμάτων κατά την χειμερινή περίοδο.

Πίνακας 4.: Χειμερινή περίοδος ανάπτυξης φυτού: συνδυασμοί ρυθμιστών αύξησης που χρησιμοποιήθηκαν

ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	
Συνδυασμός	ρυθμιστών
αύξησης	
	NAA 1 mg/l
	KIN 1 mg/l
	2,4-D 2 mg/l
	BA 1 mg/l
	NAA: KIN 1 mg/l
	KIN: 2,4-D 1:2 mg/l

Πίνακας 5.: Χειμερινή περίοδος ανάπτυξης φυτού: συνδυασμοί ρυθμιστών αύξησης που χρησιμοποιήθηκαν με την προσθήκη ασκορβικού οξέος

ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ	
Συνδυασμός	ρυθμιστών
αύξησης	
10% ασκορβικό οξύ	
	NAA 1 mg/l
	KIN 1 mg/l
	2,4-D 2 mg/l
	BA 1 mg/l
	NAA: KIN 1 mg/l
	KIN: 2,4-D 1:2 mg/l

Για τα πειράματα με έκφυτα καλοκαιρινής περιόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υποστρώματα με αυτά της χειμερινής περιόδου (1 mg/l NAA, 1 mg/l Kin, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA, συνδυασμός 1:1 NAA:Kin (1 mg/l) και 1:2 NAA:2,4-D (1 mg/l Kin, 2 mg/l 2,4-D), τα ίδια έκφυτα (φύλλα, βλαστοί) και καλλιεργήθηκε ο ίδιος αριθμός εκφύτων (100), υπό τις ίδιες συνθήκες.

Οι ίδιες εμφυτεύσεις επαναλήφθηκαν για τα ίδια υποστρώματα και υπό τις ίδιες συνθήκες, με την προσθήκη 10% ασκορβικού οξέος.

Στους πίνακες 6 και 7 περιγράφονται τα είδη των υποστρωμάτων κατά την καλοκαιρινή περίοδο.

Πίνακας 6.: Καλοκαιρινή περίοδος ανάπτυξης φυτού: συνδυασμοί ρυθμιστών αύξησης που χρησιμοποιήθηκαν

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ
Συνδυασμός ρυθμιστών αύξησης
NAA 1 mg/l
KIN 1 mg/l
2,4-D 2 mg/l
BA 1 mg/l
NAA: KIN 1 mg/l
KIN: 2,4-D 1:2 mg/l

Πίνακας 7.: Καλοκαιρινή περίοδος ανάπτυξης φυτού: συνδυασμοί ρυθμιστών αύξησης που χρησιμοποιήθηκαν με την προσθήκη Ασκορβικού οξέος

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ
Συνδυασμός ρυθμιστών αύξησης
10% ασκορβικό οξύ
NAA 1 mg/l
KIN 1 mg/l
2,4-D 2 mg/l
BA 1 mg/l
NAA: KIN 1 mg/l
KIN: 2,4-D 1:2 mg/l

3.1.6. Υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων

Οι ολιγοσακχαρίτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν i) αυτοί που απομονώθηκαν απ' ευθείας από φυτά κενάφ (*Hibiscus cannabinus L.*), δηλαδή διήθημα ημικυτταρινών, κυτταρινών και λιγνινών σε NaOH 5%, 10% και 20% (β/ο) και ii) αυτοί που προήρθαν μέσω ενζυμικών συστημάτων (μικροβιακοί βιοαντιδραστήρες) και ήταν καθαρής μορφής (Alt-4, Αλδοτετραουρονικό οξύ). Επιπρόσθετα διερευνήθηκε ανεξάρτητα η επίδραση του οξεικού νατρίου (ως βασικού συστατικού του εκχυλίσματος) και η επίδραση κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού). Η αναλυτική παραλαβή των εκχυλισμάτων περιγράφεται από τους Katapodis et al.

Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 19 τύποι υποστρώματος, οι οποίοι φαίνονται στον πίνακα 11.

Όλοι οι τύποι των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από το βασικό θρεπτικό μέσο των Murashige and Skoog (MS), (Murashige and Skoog 1962), το οποίο στερεοποιήθηκε με 1% (β/ο) άγαρ και συμπληρώθηκε με 3% (β/ο) σακχαρόζη, ρυθμιστή ανάπτυξης, ολιγοσακχαρίτες και οξεικό νάτριο σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Ο ρυθμιστής ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) σε συγκέντρωση 1 mg/lit και ο συνδυασμός αυτού με την προσθήκη 10% ασκορβικού οξέος.

Το διήθημα των ημικυτταρινών, κυτταρινών και λιγνινών σε NaOH 5%, 10% και 20% (β/0) (ουσίες Α, Β, και Γ αντίστοιχα) προστέθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις : 1, 10, 50 mg/lit για τις ουσίες Α, Β και 1, 10 mg/lit για την ουσία Γ. Το αλδοτετραουρονικό οξύ (συνθετικός ολιγοσακχαρίτης, χημικά καθαρός, προέλευσης εμπορίου), προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 1.66 και 16.6 mg/lit, και 0.3, 1.5, και 3 mg/lit ενώ το οξεικό νάτριο προστέθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις : 0.1, 0.2 και 1 g/lit θρεπτικού υποστρώματος και το εκχύλισμα ελάτου σε 1 mg/lit.

Οι τύποι των υποστρωμάτων που περιείχαν τους ρυθμιστές αύξησης και το οξεικό οξύ αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο στους 121°C, και πίεση 1.2 atm για 20 λεπτά.

Στα υποστρώματα που περιείχαν τους ολιγοσακχαρίτες έγινε αποστείρωση στο αυτόκαυστο πριν προστεθούν σε αυτά οι ολιγοσακχαρίτες. Αυτοί προστέθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής, όταν η θερμοκρασία των υποστρωμάτων ήταν περίπου 45 βαθμοί Κελσίου, και αφού πρώτα περάστηκαν μέσα από μικροβιακά φίλτρα αποστειρωμένα, διαμέτρου 0.45 μ (ψυχρή διήθηση). Το pH των διαλυμάτων πριν την προσθήκη των ολιγοσακχαριτών ρυθμίστηκε στο 5.6-5.8 με οξεικό οξύ.

Το pH όλων των υπολοίπων θρεπτικών υποστρωμάτων, πριν την αποστείρωση, ρυθμίστηκε στο 5.6-5.8 χρησιμοποιώντας 1N NaOH ή 1N HCl.

Η έγχυση των θρεπτικών υποστρωμάτων έγινε σε τρυβλία Petri διαστάσεων 100x20 mm, υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής.

Πραγματοποιήθηκαν εμφυτεύσεις σε 25 τρυβλία με τέσσερα έκφυτα το καθένα (σύνολο 100) και έξι επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση και είδος εκφύτου (σύνολο 600). Τα εμφυτευμένα τρυβλία κλείστηκαν με Parafilm™.

Η μέτρηση νωπού και ξηρού βάρους όπως και το ποσοστό καλογένεσης κι η μέτρηση των εμβρύων πραγματοποιήθηκαν την τέταρτη εβδομάδα.

Ως μάρτυρες για την σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα διαλύματα των ολιγοσακχαριτών, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των εκφύτων που εμφυτεύτηκαν στα υποστρώματα με MS + 1 mg/lit NAA και MS + 1 mg/lit NAA + 10% (β/ο) ασκορβικό οξύ.

Πίνακας 8. : Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν με την προσθήκη Εκχυλισμάτων

1.	MS + NAA
2.	MS + NAA + ασκορβικό οξύ
3.	MS + ΟΥΣΙΑ Α (1 ml/lit)
4.	MS + ΟΥΣΙΑ Α (10 ml/lit)
5.	MS + ΟΥΣΙΑ Α (50 ml/lit)
6.	MS + ΟΥΣΙΑ Β (1 ml/lit)
7.	MS + ΟΥΣΙΑ Β (10 ml/lit)
8.	MS + ΟΥΣΙΑ Β (50 ml/lit)
9.	MS + ΟΥΣΙΑ Γ (1 ml/lit)
10.	MS + ΟΥΣΙΑ Γ (10 ml/lit)
11.	MS + Alt-4 (0.3 mg/lit)

12.	MS + Alt-4 (1.5 mg/l)
13.	MS + Alt-4 (1.66 mg/l)
14.	MS + Alt-4 (3 mg/l)
15.	MS + Alt-4 (16.6 mg/l)
16.	MS + CH ₃ COONa (0.1 g/l)
17.	MS + CH ₃ COONa (0.2 g/l)
18.	MS + CH ₃ COONa (1.0 g/l)
19.	MS + E (1.0 ml /l)

3.1.7. Μελέτη της επίδρασης της φωτοπεριόδου

Τα τεμαχισμένα έκφυτα εμφυτεύτηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS) βασικό θρεπτικό μέσο με 3% (β/ο) σουκρόζη, με ρυθμιστή αύξησης 1 mg/l α -ναφθυλακετικό οξύ (NAA), ενώ η στερεοποίηση έγινε με 0.8% agar. Τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν ρυθμισμένα σε pH 5.8 με τη βοήθεια 1N NaOH ή 1N HCl, αποστειρωμένα σε autoclaved στους 121°C για 20 λεπτά και έγινε έγχυσή τους σε τρυβλία Petri των 100x20 mm (30 ml θρεπτικού μέσου/τρυβλίο, 4 έκφυτα/τρυβλίο). Σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα εμφυτεύτηκαν συνολικά 300 έκφυτα φύλλων ή βλαστών (τρεις επαναλήψεις σε κάθε υπόστρωμα, από 25 τρυβλία για κάθε επανάληψη). Τα εμφυτευμένα τρυβλία κλείστηκαν με Parafilm™.

Πραγματοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί φωτός και σκότους οι οποίοι περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ αρχικά τοποθετήθηκαν μόνο στο σκοτάδι (24 ώρες) ή μόνο στο φως (24 ώρες) έως την επαγωγή κάλου, έντασης 350–200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Μετρήθηκαν ποσοστό καλογένεσης, νωπό και ξηρό βάρος των κάλων.

Πίνακας 9. : Συνδυασμοί φωτός και σκότους που χρησιμοποιήθηκαν

Αρχικά φως	Αρχικά σκοτάδι
(24 ώρες)	(24 ώρες)
Επαγωγή κάλου	Επαγωγή κάλου
4 εβδ. φως	4 εβδ. φως
3 εβδ. Φως, 1 εβδ. Σκοτάδι	3 εβδ. Φως, 1 εβδ. Σκοτάδι
2 εβδ. Φως, 2 εβδ. σκοτάδι	2 εβδ. Φως, 2 εβδ. σκοτάδι
1 εβδ. Φως, 1 εβδ. σκοτάδι	1 εβδ. Φως, 1 εβδ. σκοτάδι
4 εβδ. σκοτάδι	4 εβδ. σκοτάδι

3.1.8. Επεξεργασία αποτελεσμάτων ιστοκαλλιεργητικών πειραμάτων

Ανάλυση δεδομένων: Οι αριθμοί των σχηματισμένων κάλων από τα έκφυτα, μορφολογία κάλων, νωπό και ξηρό βάρος καταγράφηκαν οκτώ εβδομάδες μετά την έναρξη της καλογένεσης.

Τα έκφυτα που ανταποκρίθηκαν (παρήγαγαν κάλους) χαρακτηρίζονται ως 1, ενώ αυτά που δεν ανταποκρίθηκαν χαρακτηρίζονται ως 0. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με σταθερή ανάλυση ποικιλομορφίας για πλήρες τυχαίοποιημένο σχέδιο, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MS-STATISTICA.

3.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Μελετήθηκαν κάλοι που προέκυψαν από την ιστοκαλλιέργεια διαφόρων εκφύτων ιξού (κυρίως φύλλων και βλαστών) σε υποστρώματα με διάφορους ρυθμιστές αύξησης και συνδυασμό αυτών, την προσθήκη εκχυλισμάτων ξενιστών ιξού και την προσθήκη ασκορβικού οξέος. Η συλλογή, η προετοιμασία των εκφύτων, η μέθοδος εμφύτευσης, οι συνθήκες ανάπτυξης των εκφύτων και τα βασικά διαλύματα των υποστρωμάτων που εφαρμόστηκαν είναι όμοια με αυτά της βασικής ιστοκαλλιέργειας που περιγράφονται παραπάνω.

Συνολικά εμφυτεύτηκαν 100 κάλοι σε κάθε ένα από τα παραπάνω υποστρώματα και για κάθε είδους έκφυτο.

Έγινε μακροσκοπική παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών αυτών των κάλων (ύπαρξη ή όχι εμβρύων, το σχήμα τους, το στάδιο ανάπτυξης τους) με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (μεγεθύνσεις των 630x και 350x).

3.2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

3.2.1.1. Ανάλυση Μακροστοιχείων και Μικροστοιχείων

3.2.1.1.1. Συσσώρευση επιλεγμένων μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού: επίδραση της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου.

Διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών ρυθμιστών ανάπτυξης, συνθέσεων καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκχυλίσματος (βλαστός, φύλλο) (Πίνακας 10) στη συσσώρευση K, P, Ca και Mg (μακροστοιχεία) όπως επίσης Fe, B, Cu, Zn και Mn (μικροστοιχεία) σε καλλιέργειες κάλων ιξού. Επίσης, εκτιμήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των μακροστοιχείων και των μικροστοιχείων και της ανάπτυξης της καλλιέργειας καθώς και της *in vitro* συσσώρευσης πρωτεΐνης.

Ανθισμένα και μη ανθισμένα φυτά δότες ιξού χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Τα φυτά δότες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C πριν από την αφαίρεση των εκφύτων των φύλλων και των βλαστών (μήκους 1 cm).

Τα έκφυτα φύλλων και βλαστών απολυμάνθηκαν επιφανειακά σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 1% (β/ο) για 15 λεπτά και έπειτα με διάλυμα υποχλωριούχου υδραργύρου 0.1% (β/ο) για 12 λεπτά. Όλα τα διαλύματα περιείχαν 2% (ο/ο) Tween-80. Τέλος, τα απολυμασμένα έκφυτα εκπλύθηκαν τέσσερις φορές σε στείρο απεσταγμένο νερό. Κατόπιν, τμήματα εκφύτων φύλλων μήκους 0.5 cm και βλαστών τεμαχίστηκαν και εμφυτεύτηκαν στο καλλιεργητικό μέσο. Τμήματα εκφύτων

εμφυτεύτηκαν σε καλλιεργητικό μέσο Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) το οποίο εμπλουτίστηκε με σουκρόζη 3% (β/ο) σε παραγοντικούς συνδυασμούς με δέκα διαφορετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών (PGRs: plant growth regulators) [2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D), α-ναφθυλοξικό οξύ (NAA), 6-βενζυλαδενίνη (BA) και Κινετίνη (Kin)] μόνους ή σε συνδυασμό σε ποικίλες συγκεντρώσεις (1.4 – 46.5 μM) και στερεοποιήθηκαν με άγαρ 0.8% (Πίνακας 1). Το pH των καλλιεργητικών μέσων ρυθμίστηκε στην τιμή 5.8 με τη βοήθεια NaOH 1N ή HCl 1N, ακολούθως τα καλλιεργητικά μέσα κλιβανίστηκαν στους 121 °C για 20 λεπτά και εγχύθηκαν σε τρυβλία Petri 100-x 20 mm (30 ml καλλιεργητικού μέσου / τρυβλίο, 4 έκφυτα / τρυβλίο). Συνολικά, 100 έκφυτα φύλλων ή βλαστών εμφυτεύτηκαν σε κάθε συνδυασμό καλλιεργητικού μέσου. Οι εμφυτευμένοι σωλήνες και τρυβλία σφραγίστηκαν με ParafilmTM και επώαστηκαν στους 25°C υπό 50 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFd (proton photosynthetic flux density) από λαμπτήρες φθορισμού φωτοπεριόδου 16/8 h. Μετά από καλλιέργεια 6 εβδομάδων, οι κάλοι αφαιρέθηκαν ασηπτικά από την καλλιέργεια προκειμένου να προσδιοριστούν τα μακροστοιχεία και τα μικροστοιχεία και το ξηρό βάρος.

Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην in vitro συσσώρευση μακρο- μικρο-στοιχείων: Σε ξεχωριστό πείραμα, μελετήθηκε η επίδραση του ασκορβικού οξέος στην *in vitro* συσσώρευση μακρο- και μικρο- στοιχείων εμφυτεύοντας έκφυτα φύλλων και βλαστών σε καλλιεργητικό μέσο MS με ή χωρίς ασκορβικό οξύ (10 mg L⁻¹) και εμπλουτισμένο με σουκρόζη 3% (β/ο) και 4.95 μM NAA. Μετά από καλλιέργεια 6 εβδομάδων, οι κάλοι αφαιρέθηκαν ασηπτικά από την καλλιέργεια προκειμένου να προσδιοριστούν τα μακρο- και μικρο- στοιχεία και το ξηρό βάρος.

Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας στην in vitro συσσώρευση μακρο- και μικρο- στοιχείων: Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας στην *in vitro* συσσώρευση μακροστοιχείων, έκφυτα βλαστών εμφυτεύτηκαν σε καλλιεργητικό μέσο MS εμπλουτισμένο με σουκρόζη 3% (β/ο) και 1 mg/l NAA και λαμβάνονταν μετρήσεις σε εβδομαδιαία βάση για συνολικό διάστημα χρόνου δέκα εβδομάδων.

Προσδιορισμός ξηρού βάρους και συγκέντρωσης μακρο- και μικρο- στοιχείων: Τα δείγματα ξηράθηκαν σε φούρνο στους 80°C και στη συνέχεια κονιοποιήθηκαν πριν από τη χημική ανάλυση με τη βοήθεια ενός IKA – αναλογικού μύλου (Model A10). Ο προσδιορισμός του φωσφόρου πραγματοποιήθηκε με παρατεταμένη έκθεση της σκόνης του ιστού σε φιαλίδια micro-Kjeldahl τα οποία περιείχαν 1 ml θεικού οξέος (H₂SO₄) 1N. Η ποιοτική ανάλυση του φωσφόρου πραγματοποιήθηκε χρωματομετρικά δια προσδιορισμού της απορρόφησης του συμπλέγματος του κυανού φωσφομολυβδικού οξέος στα 660 nm. Η περιεκτικότητα των ιστών σε K, Ca και Mg (μακρο-) και των Fe, Cu, Zn και Mn (μικρο-) προσδιορίστηκε κατόπιν παρατεταμένης έκθεσης σε μίγμα νιτρικών – υπερχλωρικών οξέων (HNO₃ - HClO₄). Τα συστατικά στα διαλελυμένα προϊόντα της παρατεταμένης έκθεσης προσδιορίστηκαν μέσω φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου Variant (Drossopoulos et al, 1998). Το βόριο προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, μετά από επεξεργασία με αζωμεθίνη-H (Reinbott and Blevins, 1995).

Κλαδιά από δέντρα-ξενιστές (έλατο, δρυ και καστανιά) προσβεβλημένα από ιξό, υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό τόσο των μακρο-, όσο και των μικρο-διατροφικών παραγόντων.

3.2.1.1.2. Επεξεργασία αποτελεσμάτων ανάλυσης ανόργανων στοιχείων

Σε κάθε πείραμα, δεκαπέντε τεμάχια κάλων από κάθε συνδυασμό αγωγής εξετάστηκαν μεμονωμένα για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους και της συγκέντρωσης μακροστοιχείων και των μικροδιατροφικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με την τυπική ανάλυση μεταβλητότητας για τυχαιοποιημένο δείγμα με χρήση του λογισμικού MS-STATISTICA. Οι συσχετίσεις ανάμεσα στις διάφορες συνθέσεις του καλλιεργητικού μέσου, την προέλευση του εκφύτου, τις συγκεντρώσεις των επιλεγμένων μακρο- και μικρο- διατροφικών παραγόντων και του ξηρού βάρους υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού MS-EXCEL.

Πίνακας 10. : Οι διαφορετικοί ρυθμιστές αύξησης και οι συνδυασμοί τους που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή πειραματικών καλλιεργειών κάλων από έκφυτα φύλλων και βλαστών του ιξού.

Κωδικός υποστρώματος	Συνδυασμός ρυθμιστών αύξησης
1	4.95 μM NAA
2	4.65 μM Kin
3	4.52 μM 2,4-D
4	2.8 μM BA
5	4.95 μM NAA + 2.30 μM Kin
6	4.95 μM NAA + 9.3 μM Kin
7	4.95 μM NAA + 23.25 μM Kin
8	4.95 μM NAA + 46.5 μM Kin
9	4.95 μM NAA + 1.41 μM BA
10	4.95 μM NAA + 2.82 μM BA

3.2.1.1.3. Ολικά Φαινολικά

Εκχύλιση ολικών διαλυτών φαινολικών ενώσεων: Οι διαλυτές φαινολικές ενώσεις εκχυλίστηκαν από κάλους (2 g) (προερχόμενους από έκφυτα βλαστών επωασμένα σε στερεό MS με ή χωρίς ασκορβικό οξύ (10 mg/L) και 4.95 mM NAA για 6 εβδομάδες) σε 70% MeOH στους 80 °C για 30 min και προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά στα 333 nm. Η σχετική παρουσία μη οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων μετρήθηκε εμμέσως μετρώντας την αναγωγή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} και τον επακόλουθο σχηματισμό ερυθρού συμπλέγματος χλωριούχου φαινανθρολινίου – Fe^{2+} το οποίο προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στα 510 nm.

3.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΙΞΟΥ

Για την απομόνωση πρωτοπλαστών χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα φύλλων ιξού και κάλοι προερχόμενοι από ιστοκαλλιέργεια φύλλων ιξού σε υπόστρωμα MS + 4.95 μM NAA χωρίς ασκορβικό οξύ. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στα πρωτόκολλα των Reinert και Yeoman (1982), με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Ένα γραμμάριο ιστού, κόπηκε σε κομμάτια του 1 mm² και προπλασμολύθηκε σε 50 ml υγρό διάλυμα CPW συμπληρωμένο με 0.7 M μαννιτόλη, για μία ώρα. Οι ιστοί

επωάστηκαν σε 50 ml διαλύματος ίδιας σύνθεσης με το προηγούμενο το οποίο συμπληρώθηκε με πεκτινάση (8.5 units/mg, από *Aspergillus niger*) (Fluka) (0.008 ή 0.016% β/ο) σελλουλάση (από *Trichoderma viridae*) (9.5 units/mg, 0.007 ή 0.014% β/ο) για 16 ώρες (25°C, σε σκοτάδι). Με αυτόν τον τρόπο, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί συνδυασμοί πεκτινάσης x σελλουλάσης. Μετά την διάλυση, οι πρωτοπλάστες απαλλάσσονται από το κυτταρικό τοίχωμα και τα υπολείμματα του ιστού, και φιλτράρονται πολύ καλά. Το διάλυμα με τους πρωτοπλάστες φυγοκεντρείται (100 x g, 5 min) και το υπόλειμμα διαλύεται σε διάλυμα MS με 20% (β/ο) σουκρόζη. Η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών προσδιορίστηκαν με FDA και Evan's Blue, αφού πρωτίστως μετρήθηκαν με αιματοκυττόμετρο σε μικροσκόπιο φθορισμού (Widholm, 1972, Smith, 1982).

Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με την μέθοδο της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιώντας το MS-EXCEL.

3.2.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ- ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.2.3.1. Εκχύλιση πρωτεΐνης ιξού

Διαλυτές πρωτεΐνες ιξού εκχειλίστηκαν από 200 βλαστούς φυτών-δότες και 1.000 από κάλους, οι οποίοι προέρχονται από βλαστούς του φυτού δότη. (1 g για κάθε δείγμα). Οι καλλιεργούμενοι κάλοι προέρχονται από έκφυτα βλαστών που καλλιεργήθηκαν σε MS+ 10 mg L⁻¹ ασκορβικού οξέος + 4.95 μM NAA + 2.82 μM BA. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με 10 ml Tris-EDTA ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.5 (50 mM Tris, 0.01 mM EDTA, 5% (o/o) γλυκερόλη, 20.5 mM NaCl, 100 mM (β/ο) λακτόζη και 2% (o/o) β - μερκαπτοαιθανόλη) και φυγοκεντρήθηκαν δύο φορές στις 15,000xg, 4°C για 15 min. Η λακτόζη συμπεριλήφθηκε στο διάλυμα, για την αποφυγή δέσμευσης της βισκουμίνης σε υδατανθρακικά συστατικά της ομογενοποίησης. Οι πρωτεΐνες καθιζάνουν έπειτα από 12 ώρες (overnight) στους 4°C με την προσθήκη 70% (β/ο) θειϊκού αμμωνίου, κατόπιν περνούν μέσα από στήλη Sephadex 25 – στήλη αφαλάτωσης και εκλύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA.

3.2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των παραγόμενων πρωτεϊνών γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο Bearden (Bearden, 1978). Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σύμφωνα με τον Laemmli (1979) χρησιμοποιώντας 10% gel πολυακρυλαμίδης δύο φάσεων (συσσώρευσης και διαχωρισμού). Τα gels έτρεξαν στα 200 V (30 mA) για 9 ώρες. Οι πρωτεΐνες μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν (Pharmacia calibration kit) ήταν από 5 – 212 kDa. Οι πρωτεΐνες στο gel χρωματίστηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (Oakley, 1980).

Για το σαφή προσδιορισμό των ουσιών ηλεκτροφόρησης (πιστοποίηση πρωτεϊνών), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος νιτρογλυκερίνης (Warker, 1994).

3.2.3.3. Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα

Μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της επίδρασης της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας στην ποιοτική και ποσοτική παραγωγή πρωτεϊνών ιξού που προέρχονται από κάλους του φυτού δότη ιξού. Σκοπός ήταν να διαπιστωθεί αν είναι δυνατόν να επιλεγούν κι αναπτυχθούν υψηλής απόδοσης κυτταρικές σειρές που θα

οδηγήσουν στην *in vitro* παραγωγή εκχυλισμάτων του ιξού με αυξημένη αντικαρκινική δραστηριότητα.

Σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι δότες-φυτά, ενώ οι χειρισμοί κι οι συνθήκες καλλιέργειας κι ανάπτυξης ήταν ίδιες. Συνολικά εμφυτεύτηκαν 1.500 κάλοι.

Μετά από έξι εβδομάδες καλλιέργειας, οι κάλοι τεμαχίστηκαν (σε δύο ή περισσότερα μέρη) κι επανακαλλιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα (ίδιο με το αρχικό) για τέσσερις εβδομάδες. Η διαδικασία τεμαχισμού κι επανακαλλιέργειας συνεχίστηκαν για κάθε τέσσερις εβδομάδες και συνολικά επτά φορές (υποκαλλιέργειες) για κάθε κάλο. Κάλοι από κάθε γενιά ηλεκτροφορούνταν.

Για τον προσδιορισμό των ουσιών (πρωτεϊνών) χρησιμοποιήθηκε, η μεθοδολογία που αναφέρθηκε στο 3.2.3.1 – 2.

Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με τυπική ανάλυση μεταβλητότητας για πλήρη τυχαιοποιημένο σχέδιο ομάδων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MS-STATISTICA.

3.2.5. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

Επιλέχθηκαν μία σειρά από μετρήσεις που θεωρήθηκε ότι θα βοηθήσουν στο να γίνει αντιληπτή μία αρχική προσέγγιση στην επίδραση ή όχι των ουσιών που εξετάζονται στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων.

Με βάση το βαθμό τοξικότητας των ουσιών και των συγκεντρώσεων στην οποία παρουσιάζουν αυτήν μπορεί να δοθεί μία αρχική εικόνα για τον χαρακτήρα αυτών των ουσιών (αν είναι κυτταροτοξικές ή αν υπερισχύει η ανοσορρυθμιστική τους ιδιότητα και προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων). Στη συνέχεια, μια πρώτη προσέγγιση όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης αυτών των ουσιών στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, μπορεί να γίνει μετρώντας τις ελεύθερες ρίζες (πιθανή πρόκληση παραγωγής ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια πρόκληση κυτταρικής βλάβης), το μεμβρανικό δυναμικό κυττάρων (διερεύνηση για την λειτουργικότητα των κυττάρων όσον αφορά την ακεραιότητα της μεμβρανικής λειτουργίας) και μιτοχονδρίων, και μέτρηση της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων (διερεύνηση για την φυσιολογική οξειδωτική φωσφορυλίωση και λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων).

3.2.5.1. Βιοδοκιμές Τοξικότητας σε φυσιολογικές και καρκινικές σειρές

Οι βιοδοκιμές αυτές αφορούν τη προσθήκη εκχυλίσματος από το φυτό δότη και των παραγόμενων, *in vitro*, πρωτεϊνών του γκι σε υπόστρωμα καλλιέργειας δύο σειρών ανθρωπίνων ερυθροκυττάρων (BFU-E, CFU-GM) και μίας σειράς νεφρικών κυττάρων πιθήκου (VERO). Στόχος των συγκεκριμένων βιοδοκιμών ήταν να εξεταστεί η τοξικότητα αυτών, κυρίως σε σχέση με την τοξικότητα του εκχυλίσματος που προέρχεται από το φυτό δότη. Η πραγματοποίηση αυτών των βιοδοκιμών έγινε σε συνεργασία με τη Μονάδα Μεταμοσχεύσεων Μυελού του Νοσοκομείου Παίδων “Αγία Σοφία” και στηρίχθηκε σε πρωτόκολλα τα οποία ήδη εφαρμόζονται στην συγκεκριμένη μονάδα με επιτυχία.

Τόσο οι παραγόμενες πρωτεΐνες, όσο και το εκχύλισμα από το φυτό δότη, προστέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις, στα παραπάνω υποστρώματα. Γίνεται σύγκριση με βάση την ανάπτυξη που παρατηρείται στο υπόστρωμα μάρτυρα (υπόστρωμα χωρίς πρωτεΐνη).

Στον πίνακα 11, που ακολουθεί, σημειώνονται οι σειρές φυσιολογικών κυττάρων που δοκιμάστηκαν σε σχέση με την συγκέντρωση της προστιθέμενης πρωτεΐνης και με την προέλευση αυτής (πρωτεΐνη από φυτό δότη ή παραγόμενη πρωτεΐνη από κάλο ή κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πίνακας 11.: Βιοδοκιμές τοξικότητας σε σειρές φυσιολογικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις και πηγές πρωτεϊνών.

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)				
	100	50	10	1	0,5
Φυτό	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO
Κάλο	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO
Κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO	BFU-E CFU-GM VERO

Οι βιοδοκιμές συνεχίστηκαν για δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (PC12- επινεφριδιακά κύτταρα αρουραίου-, και RAW – μακροφάγα κύτταρα ποντικού-). Προστέθηκαν και πάλι διαφορετικές συγκεντρώσεις παραγόμενης πρωτεΐνης από το φυτό δότη και τους κάλους του ιξού (κάλος και κάλος με σωμακλωνική παραλλακτικότητα). Κυρίως στόχος των βιοδοκιμών ήταν να εξεταστεί η τοξικότητα αυτών, κυρίως σε σχέση με την τοξικότητα του εκχυλίσματος που προέρχεται από το φυτό δότη. Η πραγματοποίηση αυτών των βιοδοκιμών έγινε σε συνεργασία με το τμήμα Ιατρικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα τα οποία ήδη εφαρμόζονται στο συγκεκριμένο τμήμα με επιτυχία.

Στον πίνακα 12, που ακολουθεί, σημειώνονται οι σειρές καρκινικών κυττάρων που δοκιμάστηκαν σε σχέση με την συγκέντρωση της προστιθέμενης πρωτεΐνης και με την προέλευση αυτής (πρωτεΐνη από φυτό δότη ή παραγόμενη πρωτεΐνη από κάλο ή κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πίνακας 12.: Βιοδοκιμές τοξικότητας σε σειρές καρκινικών κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις και πηγές πρωτεϊνών.

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)		
	10	1	0,5
Φυτό	PC12 RAW	PC12 RAW	PC12 RAW
Κάλο	PC12 RAW	PC12 RAW	PC12 RAW
Κάλο με σομακλωνική παραλλακτικότητα	PC12 RAW	PC12 RAW	PC12 RAW

Ο προσδιορισμός της τοξικότητας έγινε με βάση τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων (μέτρηση με τη βοήθεια αιμοκυτόμετρου) μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώασης σε κατάλληλες, για τα κύτταρα συνθήκες (θάλαμος επώασης CO₂, 37°C, σκοτάδι). Σε κάθε περίπτωση ως μάρτυρας υπήρξε η ανάλογη καλλιέργεια κυττάρων χωρίς προσθήκη ουσίας. Για κάθε δείγμα και επέμβαση υπήρξαν 4 επαναλήψεις.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση της διασποράς, για εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο, με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (ΕΣΔ), για κάθε ημέρα επώασης και επέμβαση (συγκέντρωση πρωτεϊνών) και σε επίπεδα σημαντικότητας (p) 5% (*), 1% (**), και 0,1% (***), όπως εμφανίζονται στα αντίστοιχα διαγράμματα (Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα), με την χρήση του λογισμικού MS-EXCEL.

Τέλος, με την βοήθεια της στατιστικής ανάλυσης έγινε συσχέτιση για όλες τις επεμβάσεις που έγιναν ανά κυτταρική σειρά (φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων) με τη χρήση λογισμικού MS-EXCEL.

3.2.5.2. Βιοδοκιμές ελευθέρων ριζών (ROS)

Η μέτρηση των ελευθέρων ριζών έγινε με την βοήθεια του φθορισμόμετρου με την προσθήκη της χρωστικής 2,7- dichlorodihydrofluoresceindiaceton (Schopfer, 2002) και διαλύματος PBS 0,01 M με pH 7.4 (NaCl, NaH₂PO₄·2H₂O, Na₂HPO₄·12H₂O). Πραγματοποιήθηκε τόσο σε φυσιολογική κυτταρική σειρά (VERO), όσο και σε καρκινική κυτταρική σειρά (PC12). Οι συγκεκριμένες σειρές επιλέχθηκαν, γιατί έχουν αναλυθεί σε ικανοποιητικό βαθμό από τα αντίστοιχα εργαστήρια κι είναι γνωστή η φυσιολογία τους. Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα των κυττάρων των παραπάνω σειρών, έγινε επώαση με την χρωστική, ελαφρά ανάδευση και φυγοκέντρηση. Πριν την μέτρηση φθορισμού πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του ιζήματος (που είχε σχηματιστεί λόγω φυγοκέντρησης). Μετρήσεις φθορισμού έγιναν για κάθε συγκέντρωση προστιθέμενης πρωτεΐνης και πηγής αυτής, σε κυβέτα χαλαζία (διέγερση στα 488 nm, απορρόφηση στα 732 nm).

Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με την τυπική ανάλυση μεταβλητότητας για τυχαίοποιημένο δείγμα με χρήση του λογισμικού MS-STATISTICA. Οι συσχετίσεις

ανάμεσα στις διάφορες συνθέσεις του καλλιεργητικού μέσου, την προέλευση του εκφύτου, τις συγκεντρώσεις των επιλεγμένων μακρο- και μικρο- διατροφικών παραγόντων και του ξηρού βάρους υπολογίστηκαν με χρήση του λογισμικού MS-EXCEL.

3.2.5.3. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων

Για την μέτρηση του κυτταρικού δυναμικού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα από την καλλιέργεια των κυττάρων (φυσιολογική και καρκινική σειρά και για κάθε επέμβαση). Μετά την προσθήκη της χρωστικής 3,3 dipropylthiadicarbocyanide iodido γίνεται η μέτρηση του φθορισμού (διέγερση στα 580 nm, απορρόφηση στα 665 nm) (Rosenthal and Shapiro, 1983).

3.2.5.4. Απομόνωση Μιτοχονδρίων

Επειδή τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στο ευεργετικό ισοζύγιο του κυττάρου και θα μπορούσε να υφίσταται πιθανή δράση των ουσιών σε αυτό, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει απομόνωση μιτοχονδρίων για να μετρηθεί το μεμβρανικό δυναμικό και η ενεργότητα της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε Buffer ομογενοποίησης (σουκρόζη, μαννιτόλη, bovine serum albumin, HEPES, κυστεΐνη, MgCl₂) και πραγματοποιήθηκαν μία σειρά από φυγοκεντρήσεις, και σπάσιμο των κυττάρων στους -80 °C, έλεγχος με Trypan Blue για λύση των κυττάρων, επανάληψη των φυγοκεντρήσεων μετά το σπάσιμο των κυττάρων και φύλαξη υπερκείμενου και τελευταίου ιζήματος. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C (Chirikjian, 1995). Και στις δύο μετρήσεις πάρθηκαν δείγματα από όλες τις επεμβάσεις και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

3.2.5.4.1. Βιοδοκιμές κυτοχρωμικής οξειδάσης C

Για την μέτρηση της κυτοχρωμικής οξειδάσης C χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα από την διαδικασία απομόνωσης μιτοχονδρίων, τα οποία αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20°C). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη buffer (potassium phosphate pH 7.4, 4% Triton x-100, κυτόχρωμα C, ασκορβικό οξύ). Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση σε γυάλινες κυβέτες στα 550 nm, κάθε 20 δευτερόλεπτα για 2 συνεχόμενα λεπτά (Chirikjian, 1995).

3.2.5.4.2. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων

Με την απομόνωση των μιτοχονδρίων υπάρχει επιπλέον η δυνατότητα μελέτης του μεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων, όπου έχει επιβεβαιωθεί (Braeckman et al, 2002) ότι οι αλλαγές που συμβαίνουν εκεί (στο μεμβρανικό δυναμικό των μιτοχονδρίων) σηματοδοτούνται από την κυτταρική χρησιμοποίηση ενός λιποφιλικού κατιονικού φθοριοχρώματος, του οποίου η κατανομή-διασπορά επηρεάζεται από την διαφορά δυναμικού εν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Για την μέτρηση του μεμβρανικού δυναμικού χρησιμοποιήθηκε το ίζημα από την απομόνωση των μιτοχονδρίων κι αφού επαναδιαλύθηκε σε PBS με pH 7.4, προστέθηκε χρωστική 3,3 dipropylthiadicarbocyanide iodido κι ακολούθησε μέτρηση φθορισμού (διέγερση στα 580 nm, απορρόφηση στα 665 nm) (Rosenthal and Shapiro, 1983).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

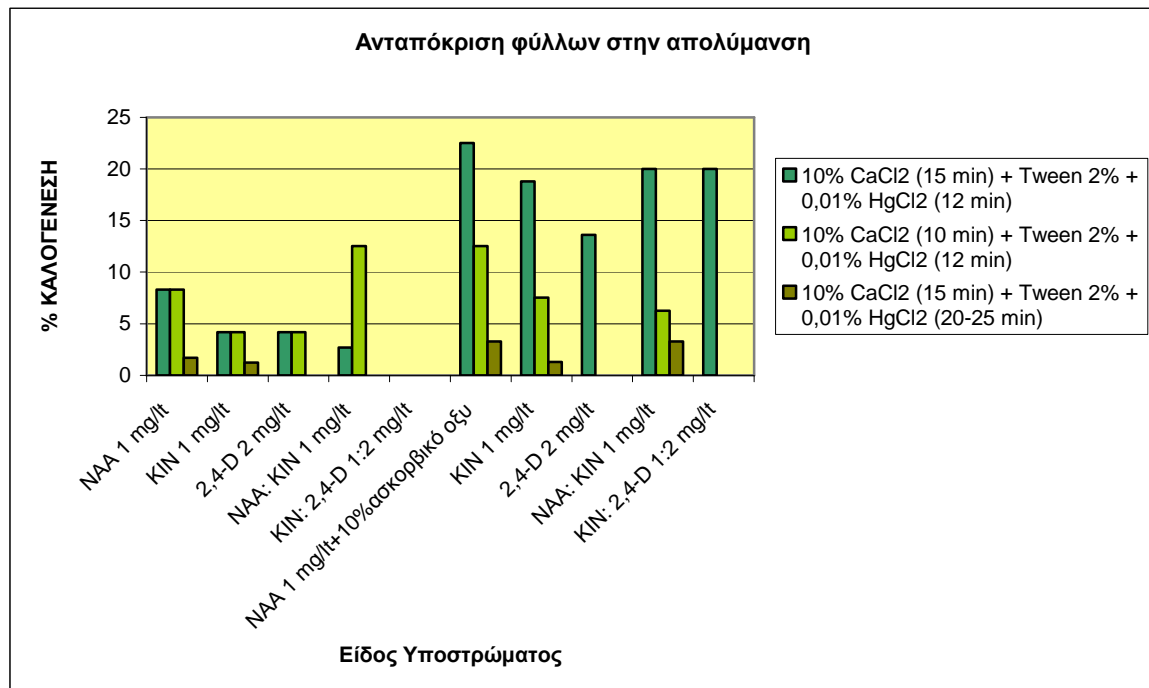
4.1. ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΙΞΟΥ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥΣ

4.1.1. Ανταπόκριση των εκφύτων στην απολύμανση

Η απολύμανση των εκφύτων με μόνο υποχλωριώδες ασβέστιο για 15 λεπτά ή με μόνο χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά ήταν εντελώς ανεπαρκής και οι καλλιέργειες μολύνθηκαν με διάφορους μικροοργανισμούς σε λίγες μόνο ημέρες μετά την εμφύτευση. Εφαρμογή χλωριούχου υδραργύρου για 20-25 λεπτά προστάτευσε από μολύνσεις αλλά προκάλεσε εκτεταμένες νεκρώσεις στα έκφυτα πριν προλάβουν να δώσουν κάλους. Γενικά, τα έκφυτα φύλλων εμφανίστηκαν να είναι πιο ευαίσθητα από τα έκφυτα βλαστών. Απολύμανση με υποχλωριώδες ασβέστιο για 15 λεπτά κι έπειτα με χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά, αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός συνδυασμός για την απολύμανση των συγκεκριμένων εκφύτων, πετυχαίνοντας προστασία από μολύνσεις και αποφυγή των νεκρωτικών κηλίδων.

Ακολουθούν διαγράμματα που παρουσιάζουν τους καλύτερους συνδυασμούς απολυμάνσεων (είδος απολύμανσης ανά υπόστρωμα, ανά είδος εκφύτου, με προσθήκη ασκορβικού οξέος) με βάση την ανταπόκριση των εκφύτων σε καλογένεση (%), ενώ οι τιμές αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 1. (Παράρτημα Πινάκων).

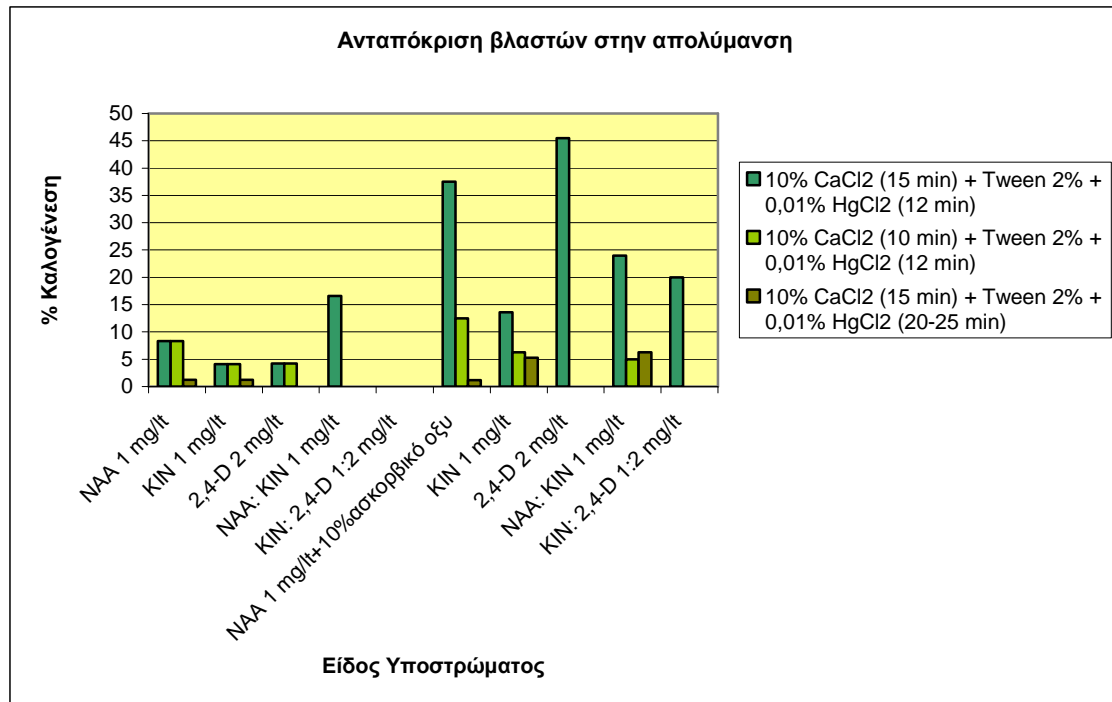
Διάγραμμα 1: Επαγωγή καλογένεσης εκφύτων ιξού (φύλλα) σε διάφορα μέσα και μεθόδους απολύμανσης, σε διάφορα είδη υποστρωμάτων (χωρίς και με ασκορβικό οξύ 10%)



Η απολύμανση με 10% CaCl₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (12 min) βοηθά την ανάπτυξη βλαστών και φύλλων (8,3% ποσοστό καλογένεσης) σε

υπόστρωμα με NAA 1mg/lit , αλλά ακόμη περισσότερο βοηθά την ανάπτυξη βλαστών σε υπόστρωμα με NAA:KIN 1mg/lit (ποσοστό καλογένεσης 16,6%), ενώ η απολύμανση με 10% CaCl₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl₂ (12 min) βοηθά περισσότερο την ανάπτυξη φύλλων σε υπόστρωμα με NAA:KIN 1mg/lit (ποσοστό καλογένεσης 12,5%).

Διάγραμμα 2: Επαγωγή καλογένεσης εκφύτων ιξού (βλαστοί) σε διάφορα μέσα και μεθόδους απολύμανσης, σε διάφορα είδη υποστρωμάτων (χωρίς και με ασκορβικό οξύ 10%)



Στην περίπτωση που προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο 10% ασκορβικό οξύ, η καλύτερη ανταπόκριση, σε ποσοστό καλογένεσης για τα φύλλα υπήρξε στον συνδυασμό απολύμανσης 10% CaCl₂ για 15 λεπτά, 2% Tween και 0,01% HgCl₂ για 12 λεπτά, ενώ στην περίπτωση που η απολύμανση με 0,01% HgCl₂ διήρκησε 20-25 λεπτά τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά.

Υποστρώματα με τα υψηλότερα ποσοστά καλογένεσης, για την καλύτερη μέθοδο απολύμανσης, ήταν για τα φύλλα το υπόστρωμα με 1 mg/lit NAA (22,5% καλογένεση), ενώ για τους βλαστούς τα υποστρώματα με 1 mg/lit NAA και με 2 mg/lit 2,4-D (37,5% και 45,5% καλογένεση, αντίστοιχα).

Επομένως, και με στατιστικά σημαντική διαφορά, ως η καλύτερη μέθοδος απολύμανσης για όλα τα είδη υποστρωμάτων, επιλέχθηκε η απολύμανση με 10% CaCl₂ για 15 λεπτά και Tween 2% και 0,01% HgCl₂ για 12 λεπτά.

Ακολουθούν οι Πίνακες Στατιστικής Ανάλυσης ανά έκφυτο. Το επίπεδο σημαντικότητας και για τους δύο είναι $\alpha=0,05$

Πίνακας 13Α: Στατιστική επεξεργασία των επεμβάσεων απολύμανσης σε έκφυτα ιξού φύλλα

Ανάλυση Διακύμανσης (Anova: Single Factor)	ΦΥΛΛΑ					
--	-------	--	--	--	--	--

ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Επεμβάσεις</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	114,3	11,43	72,18456		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	55,45	5,545	22,72358		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	10	10,85	1,085	1,794472		
ANOVA (Ανάλυση Διακύμανσης)						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	538,4795	2	269,2398	8,352611	0,0015	3,354131
Υπόλοιπο	870,3235	27	32,2342			
Σύνολο	1408,803	29				

Πίνακας 13B: Στατιστική επεξεργασία των επεμβάσεων απολύμανσης σε έκφυτα ιξού βλαστούς

ΒΛΑΣΤΟΙ						
Ανάλυση Διακύμανσης (Anova: Single Factor)						
ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Επεμβάσεις</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	173,8	17,38	221,7462		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	40,35	4,035	17,87114		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	10	15,3	1,53	5,437333		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	1451,955	2	725,9776	8,887537	0,001082	3,354131
Υπόλοιπο	2205,492	27	81,6849			
Σύνολο	3657,447	29				

Στο παράρτημα Πινάκων οι Πίνακες 13A1 και 13B1 δείχνουν τις συσχετίσεις των παραπάνω επεμβάσεων, και οι Πίνακες 13A2 και 13B2 την ανάλυση στατιστικών παραγόντων φύλλων και βλαστών αντίστοιχα.

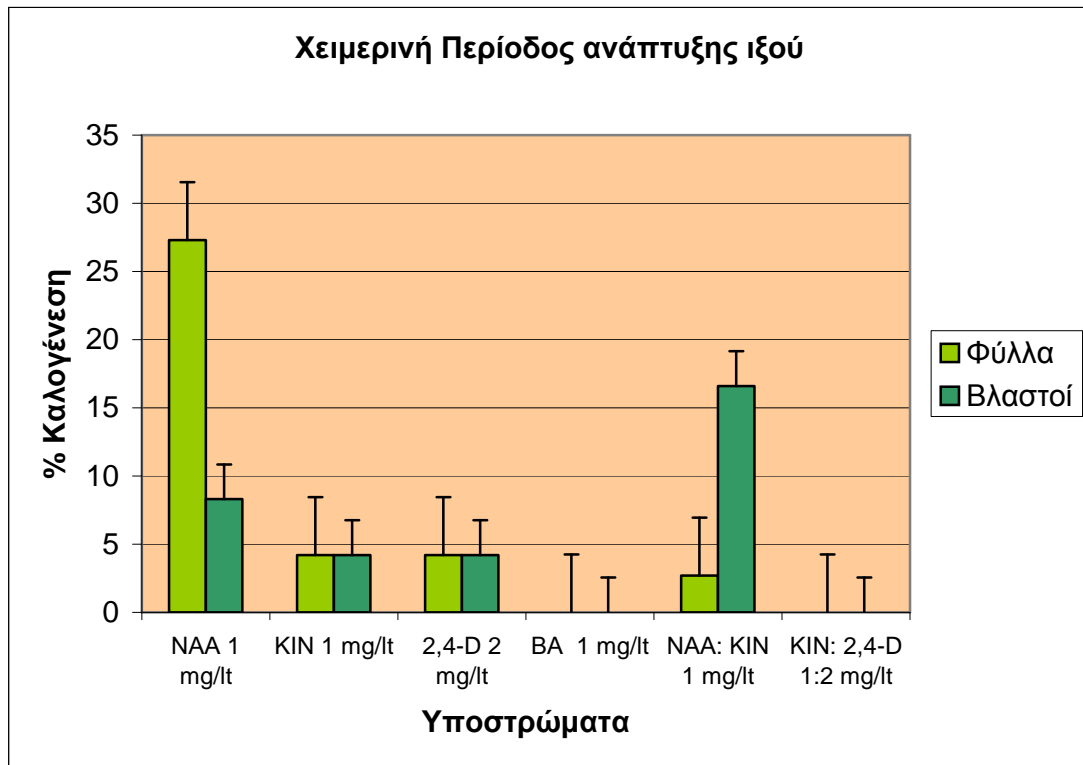
4.1.2. Επίδραση της προέλευσης του εκφύτου και της περιόδου ανάπτυξης του φυτού στην καλογένεση

Τα ποσοστά καλογένεσης ανά υπόστρωμα και έκφυτο κατά την χειμερινή και καλοκαιρινή περίοδο, περιγράφονται στους πίνακες 2., 3., 4. και 5. (Παράρτημα Πινάκων) και στα αντίστοιχα διαγράμματα. Αφορούν έκφυτα βλαστών και φύλλων, καθώς έκφυτα που προήλθαν από ανθήρες και καρπών (εμφύτευση εμβρύων) δεν μπόρεσαν να δώσουν κάλους.

Δεν υπήρξε καλογένεση για την καλοκαιρινή περίοδο για όλα τα είδη και τους συνδυασμούς υποστρωμάτων που εφαρμόστηκαν.

Κατά την χειμερινή περίοδο υπήρξε θετική ανταπόκριση των εκφύτων (φύλλων και βλαστών) σε όλα σχεδόν τα είδη και τους συνδυασμούς των υποστρωμάτων (Πίνακας 2) και περιγράφεται από το παρακάτω διάγραμμα.

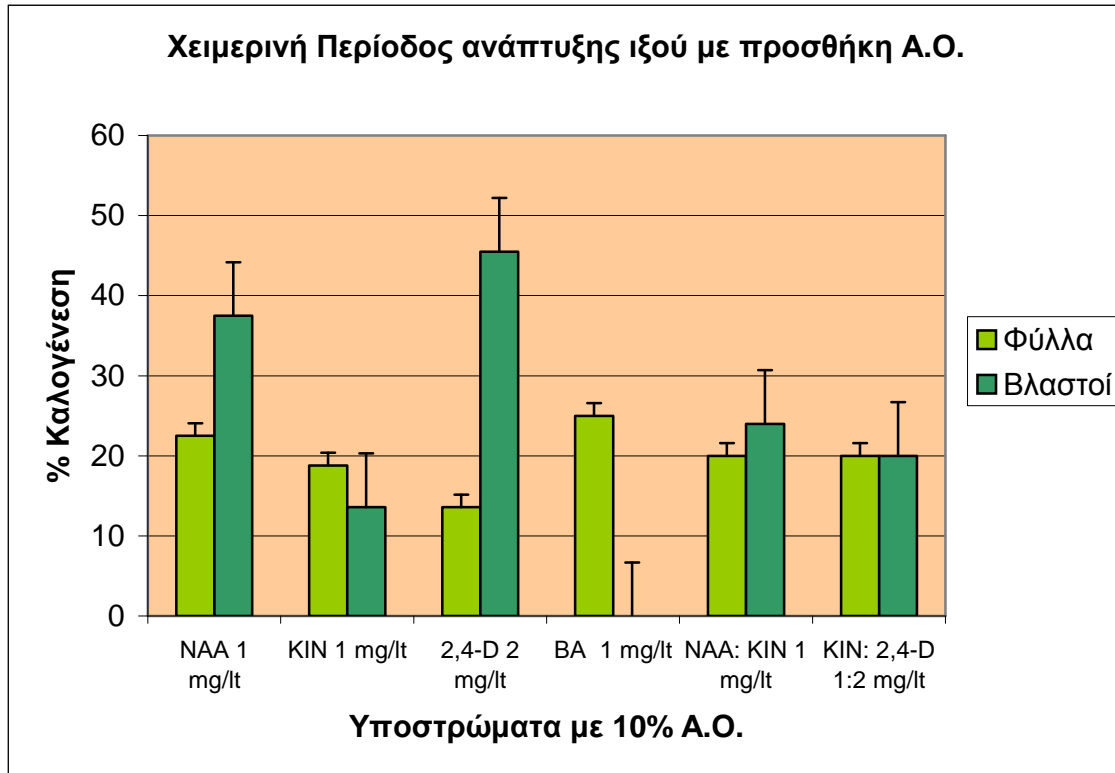
Διάγραμμα 3: Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού (φύλλα και βλαστοί) κατά την χειμερινή περίοδο σε διάφορα είδη υποστρωμάτων



Ιδιαίτερη ανάπτυξη κάλων, κατά την χειμερινή περίοδο, παρατηρήθηκε στα έκφυτα φύλλων που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 1 mg/l NAA (27,3%), ενώ για τους βλαστούς της συγκεκριμένης χρονικής περιόδου, το καλύτερο υπόστρωμα ήταν αυτό με την προσθήκη NAA:KIN 1 mg/l (16,6%).

Ανταπόκριση υπήρξε επίσης και στα υποστρώματα που περιείχαν 10% Ασκορβικό οξύ. Τα αποτελέσματα περιγράφονται στο παρακάτω διάγραμμα, ενώ οι αναλυτικές τιμές φαίνονται στον Πίνακα 3. (Παράρτημα Πινάκων).

Διάγραμμα 4: Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού (φύλλα και βλαστοί) κατά την χειμερινή περίοδο σε διάφορα είδη υποστρώματων που περιείχαν 10% ασκορβικό οξύ



Στις συγκεκριμένες καλλιέργειες, φάνηκε ότι η προσθήκη του ασκορβικού οξέος, ενίσχυσε τα ποσοστά καλογένεσης των εκφύτων σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα και για τα δύο είδη εκφύτων. Καλογένεση παρατηρήθηκε ακόμη και σε εκείνα τα υποστρώματα που χωρίς την προσθήκη του ασκορβικού δεν είχαν δώσει αποτελέσματα (1 mg/lt BA, 1:2 mg/lt KIN: 2,4-D). Τα μεγαλύτερα ποσοστά καλογένεσης για τα φύλλα παρουσιάστηκαν στο υπόστρωμα με 1 mg/lt NAA (22,5%), ενώ για τους βλαστούς στα υποστρώματα με 1 mg/lt NAA (37,5%) και 2 mg/lt 2,4-D (45,5%).

Με βάση τους πίνακες στατιστικής ανάλυσης των παραπάνω δεδομένων, επιλέχθηκε η χειμερινή περίοδος συλλογής των εκφύτων του ιξού, ως η αποδοτικότερη για την καλογένεση ιστών.

Πίνακας 15Α. Ανάλυση της περιόδου ανάπτυξης του ιξού σε σχέση με την καλλιέργεια εκφύτων (φύλλων και βλαστών) του ιξού σε διάφορα υποστρώματα

Ανάλυση Διακύμανσης (Anova: Two-Factor Without Replication)				
ΣΥΝΟΨΗ	Καταμέτρηση	Σύνολο	Μέσος όρος	Διακύμανση
NAA 1 mg/lt	4	95,6	23,9	147,28
KIN 1 mg/lt	4	40,8	10,2	52,50667
2,4-D 2 mg/lt	4	67,5	16,875	383,8092
BA 1 mg/lt	4	25	6,25	156,25
NAA: KIN 1 mg/lt	4	63,3	15,825	85,70917
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	4	40	10	133,3333
Φύλλα	6	38,4	6,4	108,42
Βλαστοί	6	33,3	5,55	38,983
Φύλλα (A.O.)	6	119,9	19,98333	14,72967
Βλαστοί (A.O.)	6	140,6	23,43333	268,5467

Το επίπεδο σημαντικότητας για τον παραπάνω πίνακα είναι $\alpha=0,05$.

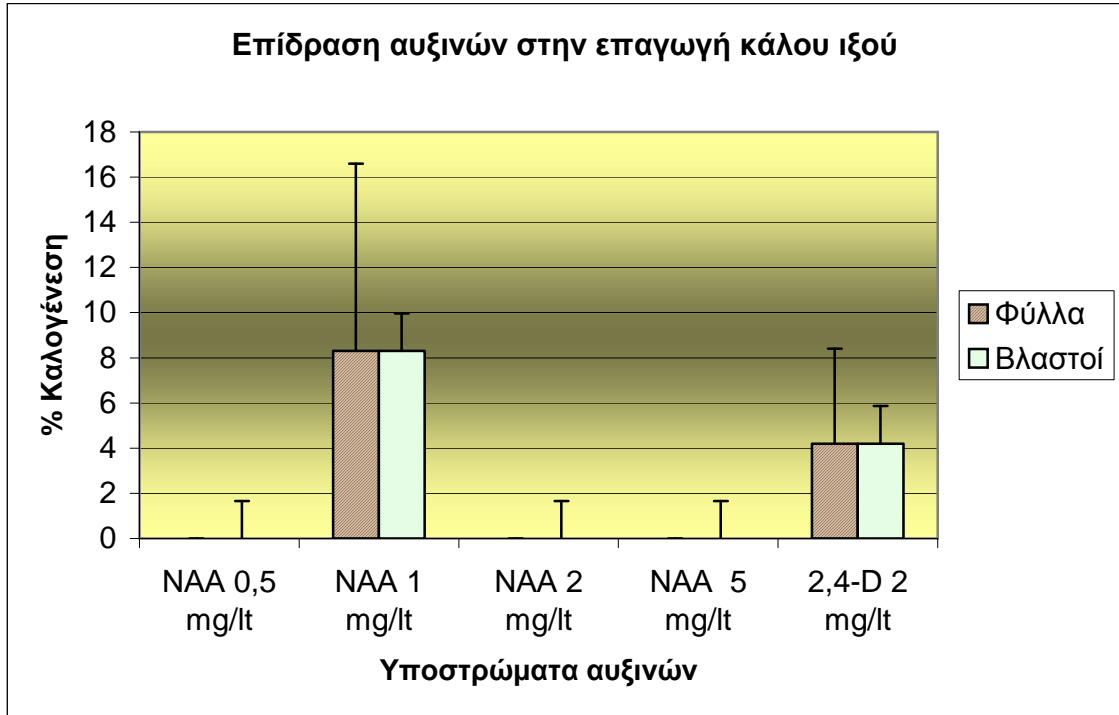
Στο Παράρτημα των Πινάκων (Πίνακας 15B) περιλαμβάνεται και ο πίνακας συσχετίσεων.

4.2 ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

4.2.1 Υποστρώματα με αυξίνες

Από την κατηγορία των ορμονών - αυξίνες, προστέθηκαν στα υποστρώματα και των δύο εκφύτων (φύλλα, βλαστοί) σε διάφορες συγκεντρώσεις NAA και 2,4-D (Πίνακας 18.)

Διάγραμμα 5: Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού (φύλλα και βλαστοί) σε διαφορετικά είδη υποστρωμάτων αυξινών



Τα υψηλότερα ποσοστά καλογένεσης παρατηρήθηκαν για το υπόστρωμα με συγκέντρωση 1 mg/l NAA τόσο στα έκφυτα φύλλων, όσο και στα έκφυτα βλαστών (8,3%). Επομένως η παραπάνω συγκέντρωση, θεωρήθηκε η καλύτερη όσον αφορά την αυξίνη NAA. Η αυξίνη 2,4-D έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στην συγκέντρωση 2 mg/l (ποσοστό καλογένεσης 4,2% και στα δύο είδη εκφύτων). Τελικά, όπως φαίνεται κι από τον Πίνακα 6., η αυξίνη με την υψηλότερη καλογένεση είναι η αυξίνη NAA στην συγκέντρωση του 1 mg/l.

Πίνακας 18Α. Στατιστική ανάλυση των διαφορετικών υποστρωμάτων αυξινών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια εκφύτων ιξού (Φύλλων και βλαστών).

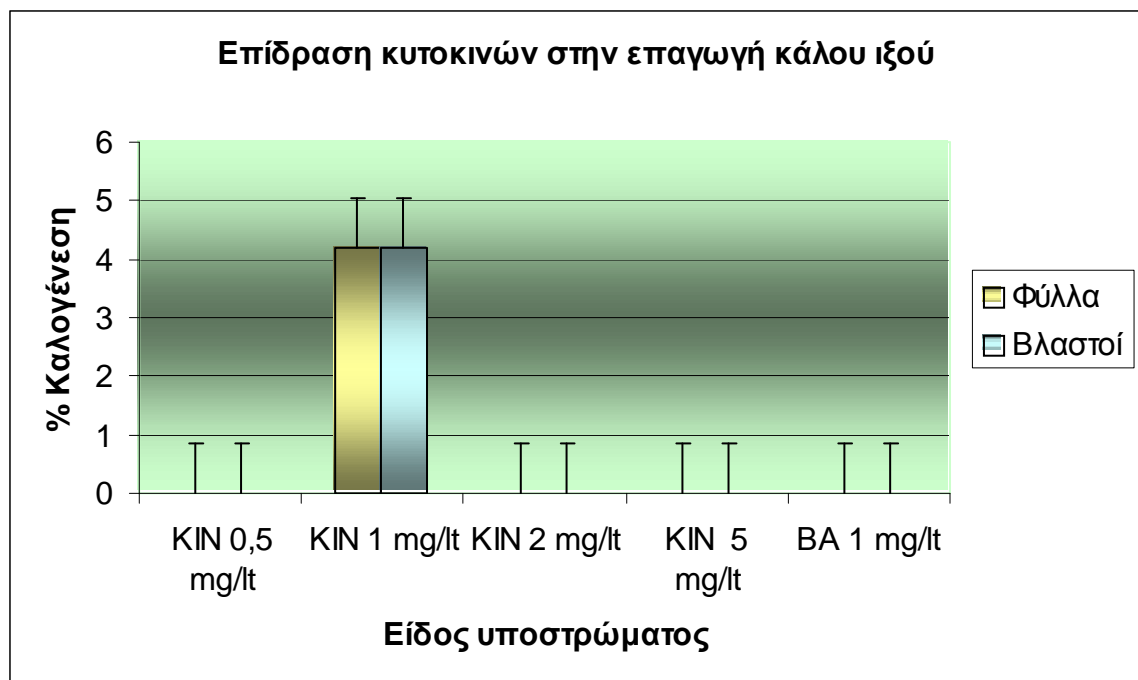
Ανάλυση Διακύμανσης (Anova: Two-Factor Without Replication)						
ΣΥΝΟΨΗ	Καταμέτρηση	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
NAA 0,5 mg/l	2	0	0	0		
NAA 1 mg/l	2	16,6	8,3	0		
NAA 2 mg/l	2	0	0	0		
NAA 5 mg/l	2	0	0	0		
2,4-D 2 mg/l	2	8,4	4,2	0		
Φύλλα	5	12,5	2,5	13,82		
Βλαστοί	5	12,5	2,5	13,82		
ANOVA						
Πηγή Παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit

Επεμβάσεις	110,56	4	27,64	-3,9E+15	#ΑΡΙΘ!	6,388234
Έκφυτο	0	1	0	0	#ΑΡΙΘ!	7,70865
Σφάλμα	-2,8E-14	4	-7,1E-15			
Σύνολο	110,56	9				

4.2.2. Υποστρώματα με κυτοκινίνες

Από την κατηγορία των ορμονών - κυτοκίνες, προστέθηκαν στα υποστρώματα και των δύο εκφύτων (φύλλα, βλαστοί) σε διάφορες συγκεντρώσεις KIN και BA (Πίνακας 19)

Διάγραμμα 6: Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού (φύλλα και βλαστοί) σε διαφορετικά είδη υποστρωμάτων κυτοκινών



Η μόνη κυτοκίνη που έδωσε αποτελέσματα καλογένεσης, ήταν η κινετίνη (KIN) στην συγκέντρωση του 1 mg/l. Παρατηρήθηκε, τόσο στα έκφυτα φύλλων, όσο και στα έκφυτα βλαστών ποσοστό καλογένεσης 4,2% (Πίνακας 19. Παράρτημα Πινάκων)

Πίνακας 19Α. Ανάλυση των διαφορετικών υποστρωμάτων κυτοκινών που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια εκφύτων ιξού (φύλλων και βλαστών)

Ανάλυση Διακύμανσης (Ανοva: Single Factor)						
ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Είδος Επέμβασης</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
KIN 0,5 mg/lt	5	4,2	0,84	3,528		
KIN 1 mg/lt	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
KIN 2 mg/lt	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
KIN 5 mg/lt	5	4,2	0,84	3,528		
BA 1 mg/lt	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	65535	4	65535	65535	#ΑΡΙΘ!	5,192163
Υπόλοιπο	65535	5	65535			
Σύνολο	28,224	9				

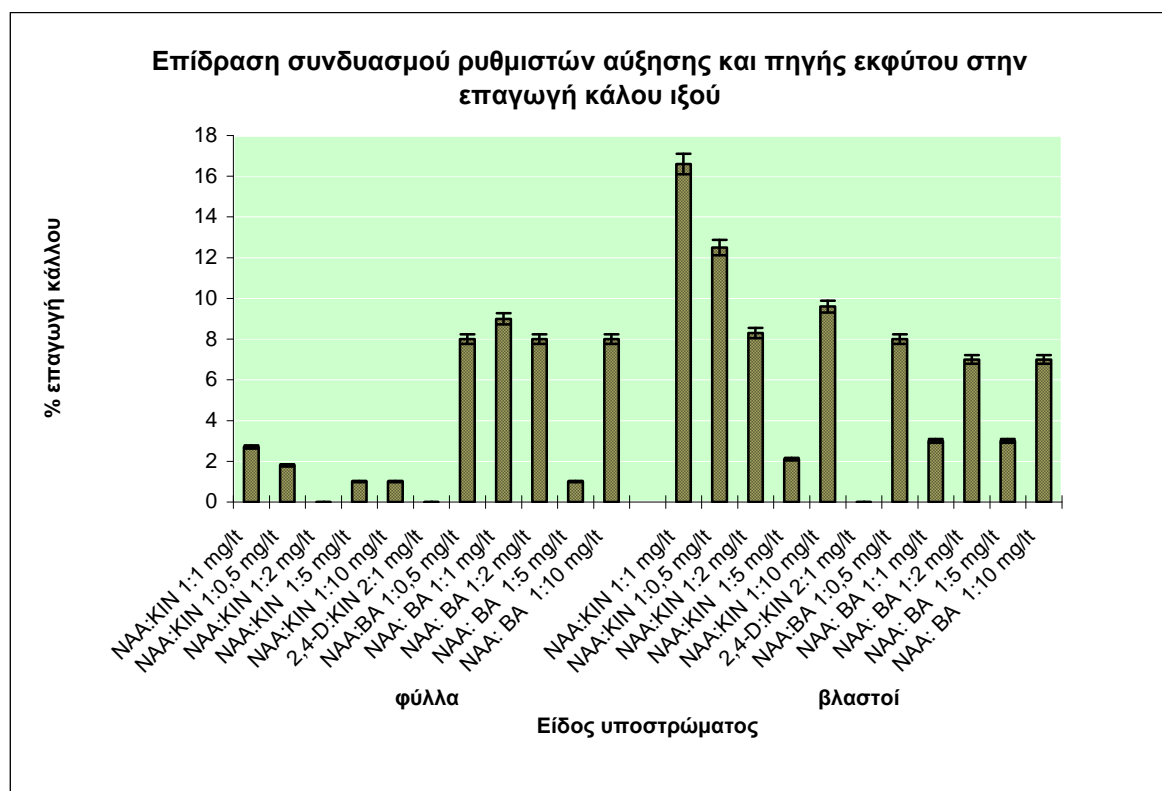
Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$

Ο πίνακας συσχετίσεων (Πίνακας 19B) περιλαμβάνεται στο Παράρτημα Πινάκων.

4.2.3. Συνδυασμοί Υποστρωμάτων

Από τους διάφορους συνδυασμούς αυξινών με κυτοκίνες που προστέθηκαν στα υποστρώματα, σε διάφορους συνδυασμούς συγκεντρώσεων, για τα έκφυτα των φύλλων φάνηκε ότι η καλύτερη ανταπόκριση σε καλογένεση, υπήρξε για τους συνδυασμούς NAA με BA, ενώ για τα έκφυτα των βλαστών για τους συνδυασμούς NAA με KIN. Το διάγραμμα 19. που ακολουθεί περιγράφει αναλυτικά τους συνδυασμούς, ενώ στον Πίνακα 20. (Παράρτημα Πινάκων) αναγράφονται αναλυτικά τα ποσοστά καλογένεσης ανά συνδυασμό και έκφυτο.

Διάγραμμα 7: Επίδραση έντεκα διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης και πηγή εκφύτου σε επαγωγή κάλου από ιξό. (*Viscum album* L.). (**)



** (1) NAA + Kin 1:1 mg/l (2) NAA + Kin 1:0,5 mg/l (3) NAA + Kin 1:2 mg/l (4) NAA + Kin 1:5 mg/l (5) NAA + Kin 1:10 mg/l (6) 2,4-D:KIN 2:1 mg/l (7) NAA + BA 1:0,5 mg/l (8) NAA + BA 1:1 mg/l (9) NAA + BA 1:2 mg/l (10) NAA + BA 1:5 mg/l (11) NAA + BA 1:10 mg/l.

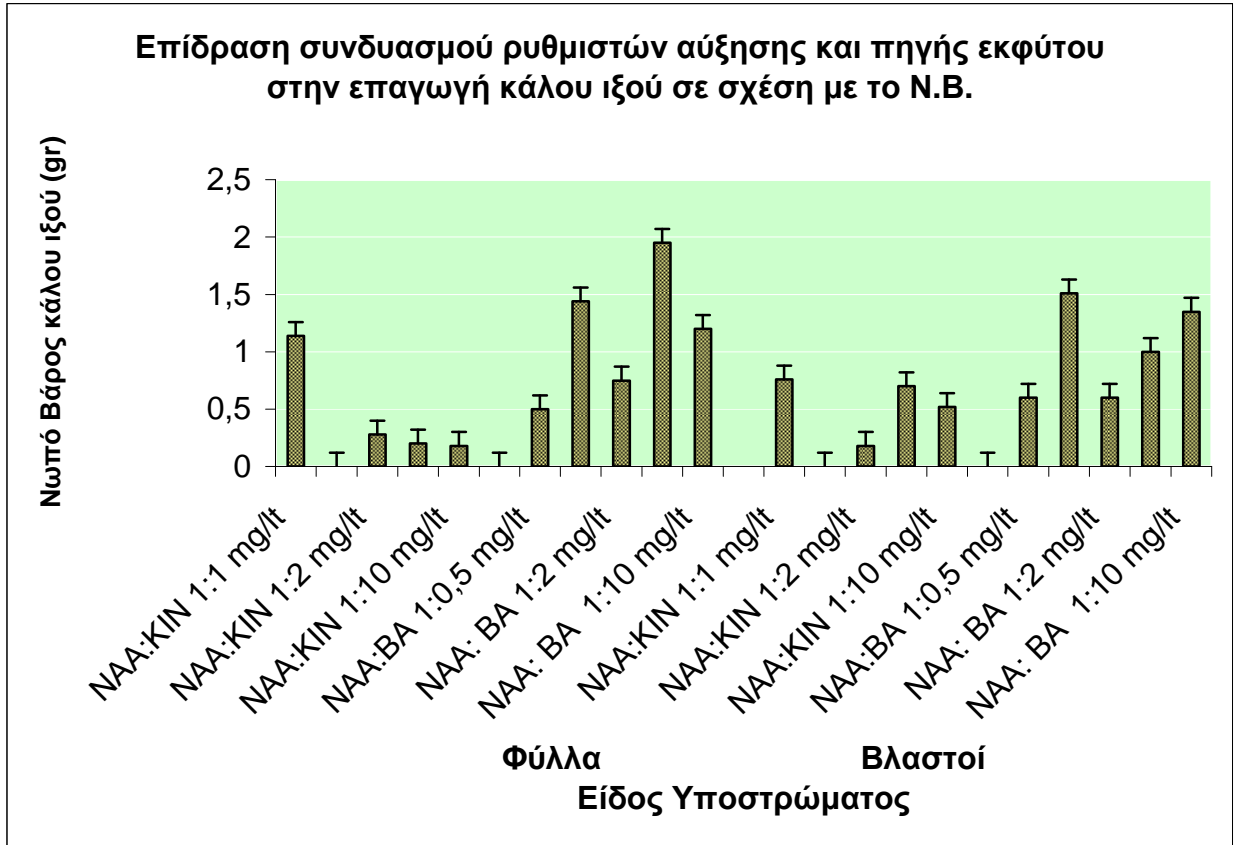
Ανάλυση των αποτελεσμάτων καλογένεσης στους παραπάνω διάφορους συνδυασμούς υποστρωμάτων, έγινε και με βάση το Νωπό και Ξηρό Βάρος των παραγόμενων κάλων (Πίνακας 20., Παράρτημα Πινάκων).

Στο Διάγραμμα 8. παρουσιάζονται τα διαγράμματα με βάση των Νωπό Βάρος των παραγόμενων κάλων στα διάφορα υποστρώματα, ενώ στο Διάγραμμα 9 με βάση το Ξηρό Βάρος.

Στα υποστρώματα με τους συνδυασμένους ρυθμιστές αύξησης, βαρύτερους κάλους (νωπό βάρος) φαίνεται να δίνει ο συνδυασμός NAA : BA σε αναλογία 1:5, και γενικότερα όλοι οι συνδυασμοί αυτών των δύο ρυθμιστών αύξησης δίνουν μεγαλύτερα βάρη κάλων από ότι ο συνδυασμός NAA με KIN ή 2,4-D με KIN. Αυτό διαπιστώνεται ότι ισχύει και στα δύο είδη εκφύτων που καλλιεργήθηκαν (φύλλα, βλαστοί).

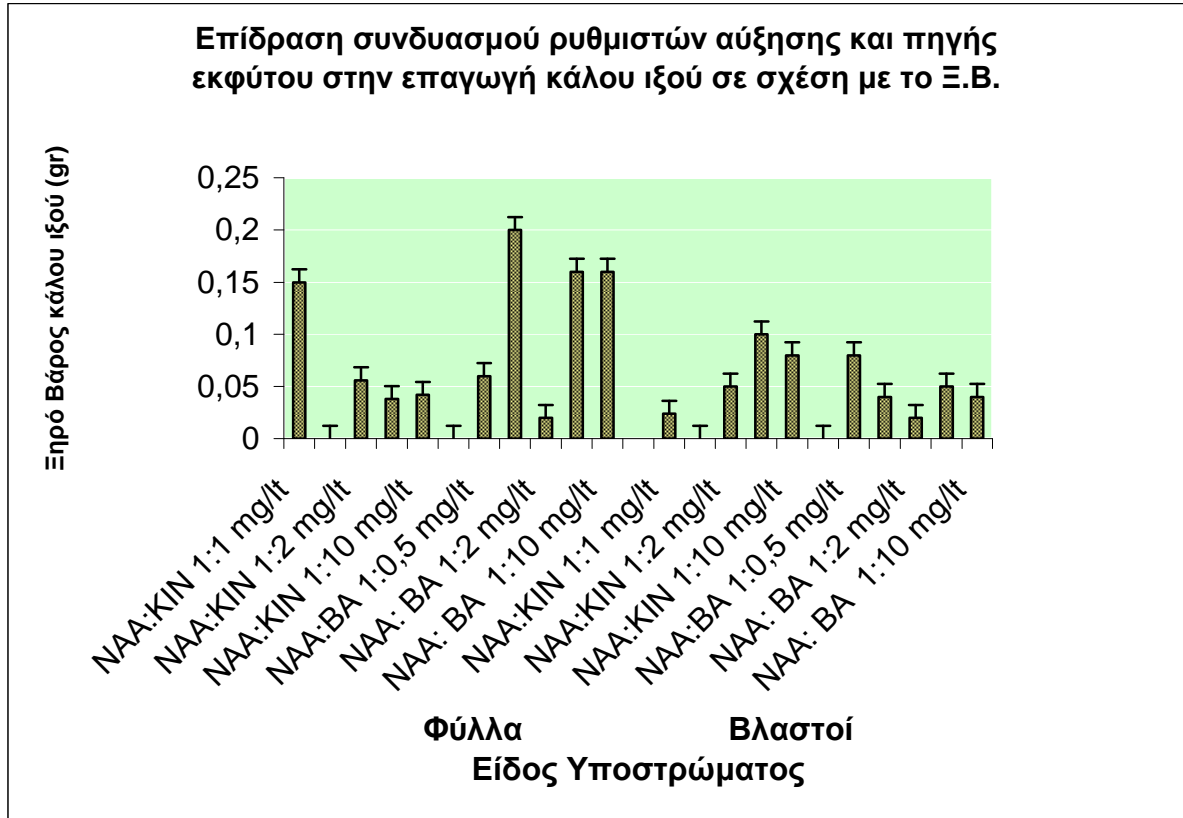
Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Ξηρού Βάρους, επίσης διαπιστώνεται ότι οι κάλοι που προέρχονται από τους συνδυασμούς με NAA και BA έχουν μεγαλύτερο βάρος από τους υπόλοιπους.

Διάγραμμα 8: Επίδραση έντεκα διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης και πηγή εκφύτου σε νωπό βάρος κάλου από ιζό. (**)



** (1) NAA + Kin 1:1 mg/lt (2) NAA + Kin 1:0,5 mg/lt (3) NAA + Kin 1:2 mg/lt (4) NAA + Kin 1:5 mg/lt (5) NAA + Kin 1:10 mg/lt (6) 2,4-D:KIN 2:1 mg/lt (7) NAA + BA 1:0,5 mg/lt (8) NAA + BA 1:1 mg/lt (9) NAA + BA 1:2 mg/lt (10) NAA + BA 1:5 mg/lt (11) NAA + BA 1:10 mg/lt.

Διάγραμμα 9: Επίδραση έντεκα διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης και πηγή εκφύτου σε ξηρό βάρος κάλου από ιξό. (**)



** (1) NAA + Kin 1:1 mg/lit (2) NAA + Kin 1:0,5 mg/lit (3) NAA + Kin 1:2 mg/lit (4) NAA + Kin 1:5 mg/lit (5) NAA + Kin 1:10 mg/lit (6) 2,4-D:KIN 2:1 mg/lit (7) NAA + BA 1:0,5 mg/lit (8) NAA + BA 1:1 mg/lit (9) NAA + BA 1:2 mg/lit (10) NAA + BA 1:5 mg/lit (11) NAA + BA 1:10 mg/lit.

Πίνακας 25.: Ανάλυση διαφορών των επαγόμενων κάλων και αύξησης (νωπό και ξηρό βάρος) από ιξό σε σχέση με το έκφυτο (βλαστός, φύλλο) και έντεκα ρυθμιστές αύξησης.

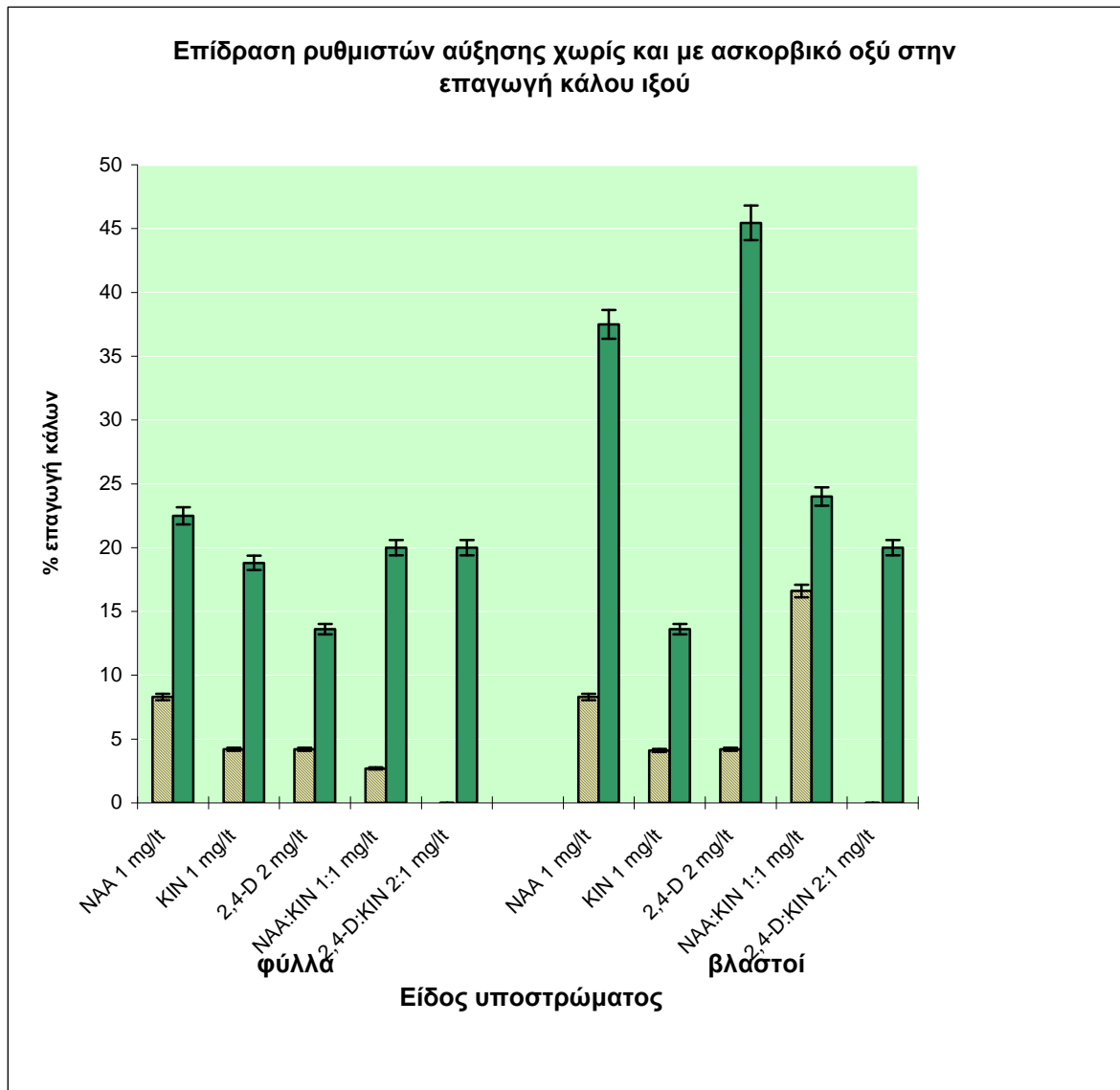
Είδος Επέμβασης	B.E.	Επαγωγή	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη
		κάλου (%)	κάλου (Νωπό Βάρος)	κάλου (Ξηρό Βάρος)
		Μέσο	Μέσο	Μέσο
		Τετράγωνο	Τετράγωνο	Τετράγωνο
Πηγή Εκφύτου (A)	1	0.589091***	0.384861***	0.017478****
Ρυθμιστής Ανάπτυξης (B)	10	0.195091****	1.216112****	0.093205****
(A X B)	1	0.183091****	0.264836****	0.063268****
Σφάλμα	1087	0.020006	0.00005	0.0000001
Σύνολο	1099			

*** p < 0.001, **** p < 0.0001

4.2.4. Υποστρώματα με Ασκορβικό οξύ

Στο παρακάτω διάγραμμα, διακρίνονται οι διαφορές στην % επαγωγή των κάλων ανάμεσα στα διάφορα υποστρώματα (χωρίς και με 10% ασκορβικό οξύ) τόσο για τα έκφυτα που προέρχονται από τα φύλλα, όσο και για τα έκφυτα που προέρχονται από βλαστούς. Η προσθήκη 20% ασκορβικού οξέος έδωσε αποτελέσματα χαμηλής επαγωγής κάλου και μόνο για τον χειρισμό με ρυθμιστή αύξησης NAA στην συγκέντρωση του 1 mg/lit και για τα δύο είδη εκφύτων (φύλλα και βλαστοί) σε ποσοστό 3,8% (Πίνακας 21, Παράρτημα Πινάκων).

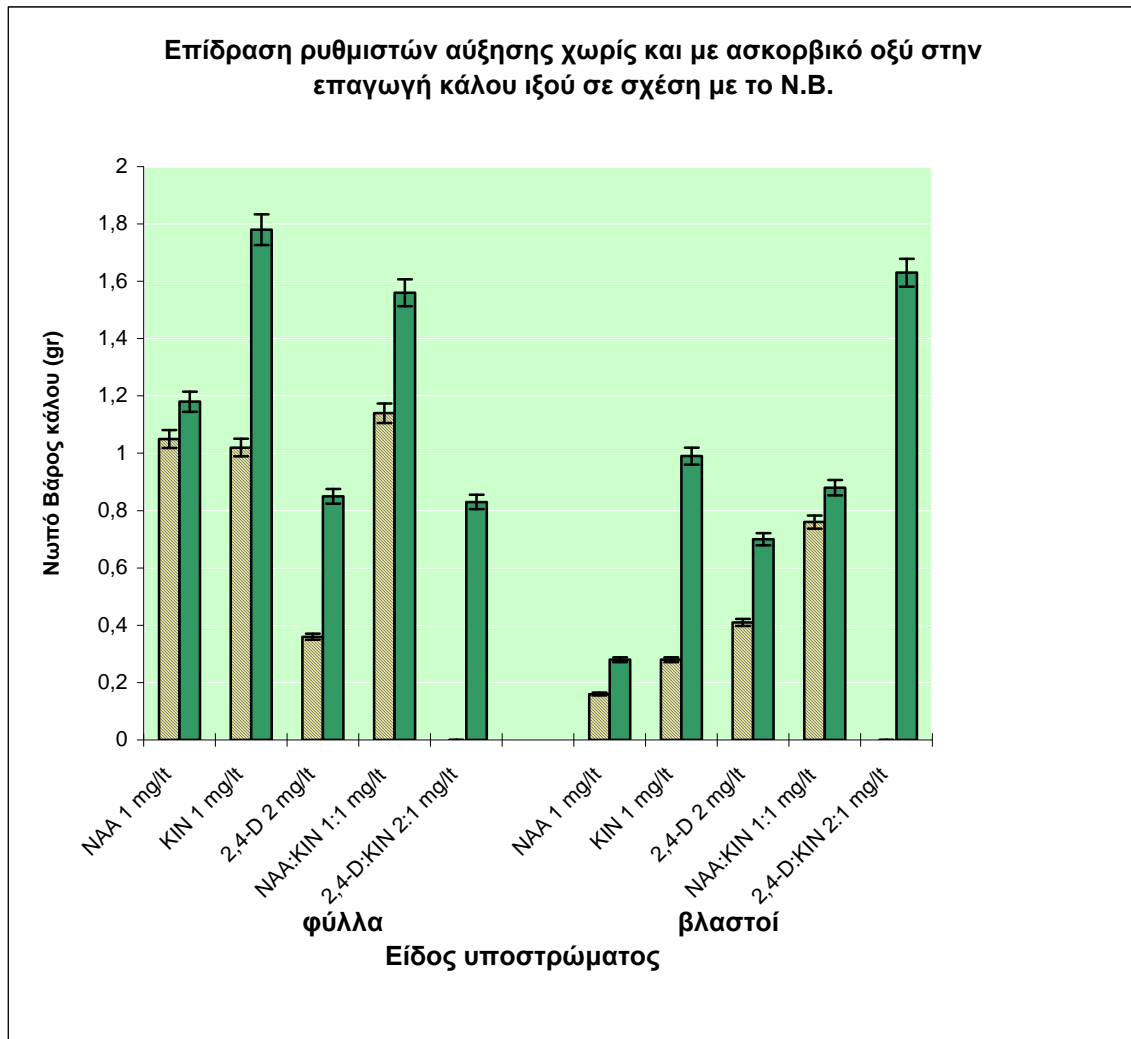
Διάγραμμα 10: Επίδραση πέντε διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης, πηγή εκφύτου και ασκορβικό οξύ στην επαγωγή κάλου από ιξό (*Viscum album L.*). (σκιασμένες μπάρες = θρεπτικό μέσο χωρίς ασκορβικό, πράσινες μπάρες = θρεπτικό μέσο με ασκορβικό).



Η προσθήκη 10% ασκορβικού οξέος προάγει την επαγωγή καλογένεσης σε όλους τους χειρισμούς που έγιναν με τους διάφορους ρυθμιστές αύξησης, τόσο στα έκφυτα των φύλλων όσο και στα έκφυτα των βλαστών. Ιδιαίτερη αύξηση μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος, παρατηρείται στα έκφυτα των φύλλων για τον χειρισμό με 1 mg/lit NAA και για τα έκφυτα των βλαστών για τους χειρισμούς 1

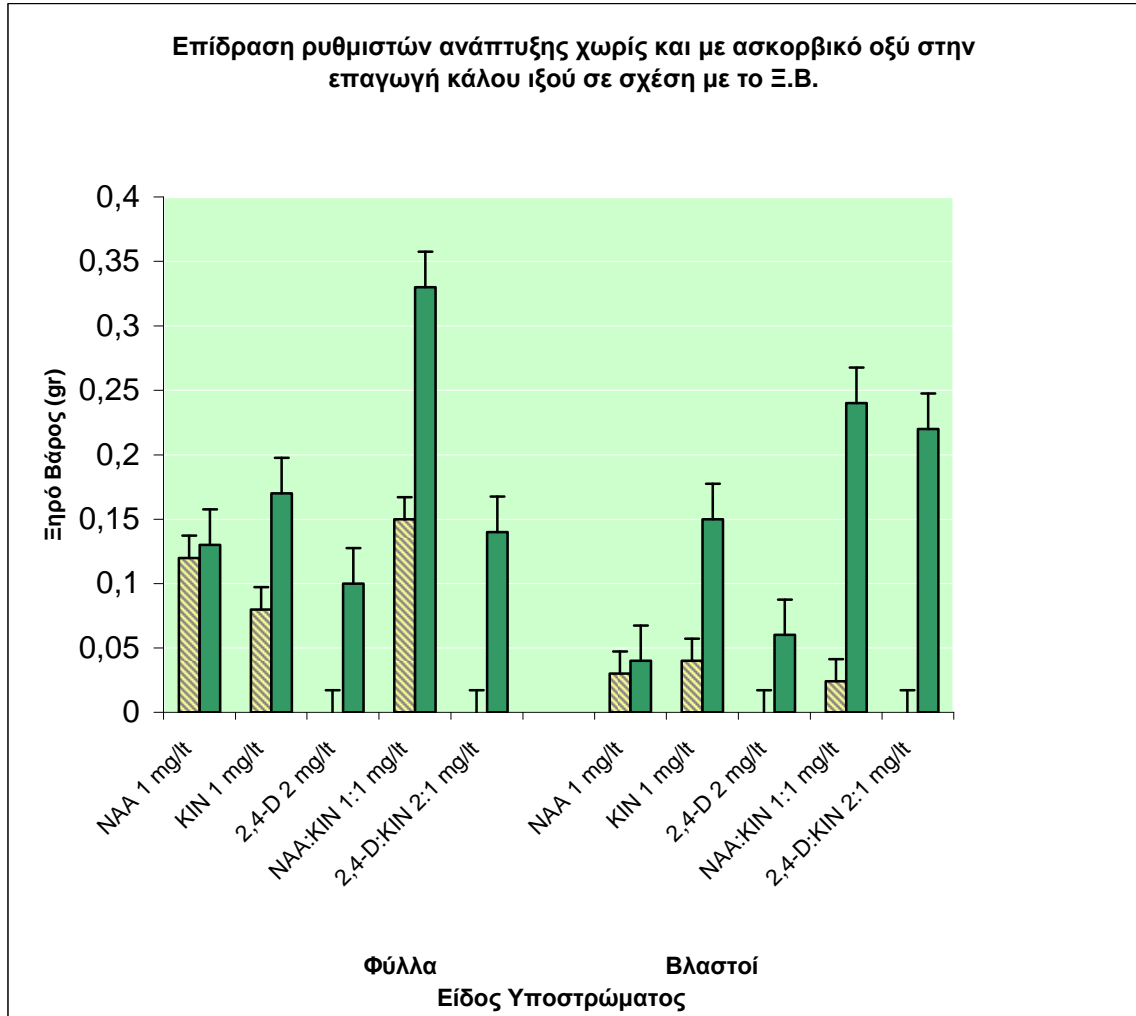
mg/lit NAA και 2 mg/lit 2,4- D. Χαρακτηριστικό δε είναι, ότι και για τα δύο είδη εκφύτων ο αρχικός χειρισμός με μόνο 2:1 mg/lit 2,4-D:KIN δεν έδωσε αποτελέσματα, ενώ μετά και την προσθήκη 10% ασκορβικού οξέος υπήρξε επαγωγή καλογένεσης σε ποσοστό 20% (Πίνακας 21, Παράρτημα Πινάκων).

Διάγραμμα 11: Επίδραση πέντε διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης, πηγή εκφύτου και ασκορβικό οξύ σε νωπό βάρος κάλου από ιξό. (σκιασμένες μπάρες = θρεπτικό μέσο χωρίς ασκορβικό οξύ, πράσινες μπάρες = θρεπτικό μέσο με ασκορβικό οξύ).



Η προσθήκη ασκορβικού σε όλα τα υποστρώματα έδωσε βαρύτερους κάλους, όσον αφορά τα Νωπά Βάρη, σε όλα τα είδη εκφύτων.

Διάγραμμα 12: Επίδραση πέντε διαφορετικών χειρισμών με ρυθμιστές αύξησης, πηγή εκφύτου και ασκορβικό οξύ σε ξηρό βάρος κάλου από ιξό. (μαύρες μπάρες = θρεπτικό μέσο χωρίς ασκορβικό οξύ, σκιασμένες μπάρες = θρεπτικό μέσο με ασκορβικό οξύ).



Κατά την μέτρηση του Ξηρού Βάρους, την μεγαλύτερη τιμή για κάλο προερχόμενο από έκφυτο φύλλου, παρουσιάζει το υπόστρωμα με ρυθμιστές αύξησης NAA : KIN και συγκέντρωση 1:1 mg/Lt, ενώ για κάλο προερχόμενο από έκφυτο βλαστού, οι μεγαλύτερες τιμές παρουσιάζονται για τους συνδυασμούς NAA:KIN 1:1 mg/Lt, και 5: 2,4-D:KIN 2:1 mg/Lt.

Πίνακας 26.: Ανάλυση διαφορών των επαγόμενων κάλων και αύξησης (νωπό και ξηρό βάρος) από ιξό σε σχέση με το είδος του εκφύτου (βλαστός, φύλλο), το ασκορβικό οξύ και πέντε ρυθμιστές αύξησης.

Είδος Επέμβασης	B.E	Επαγωγή κάλου	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη κάλου
		(%)	κάλου	(Ξηρό Βάρος)
		Μέσο	Μέσο	Μέσο
		Τετράγωνο	Τετράγωνο	Τετράγωνο
Πηγή Εκφύτου (A)	1	16.562****	2.382643***	0.085888*
Ασκορβικό οξύ (B)	1	1.458****	0.889654***	0.001415 ^{ns}
Ρυθμιστής Ανάπτυξης (C)	4	0.62125****	0.158135****	0.023997**
(A X B)	1	0.338**	0.012142**	0.005143 ^{ns}
(A X C)	4	0.33325****	0.222545****	0.053722***

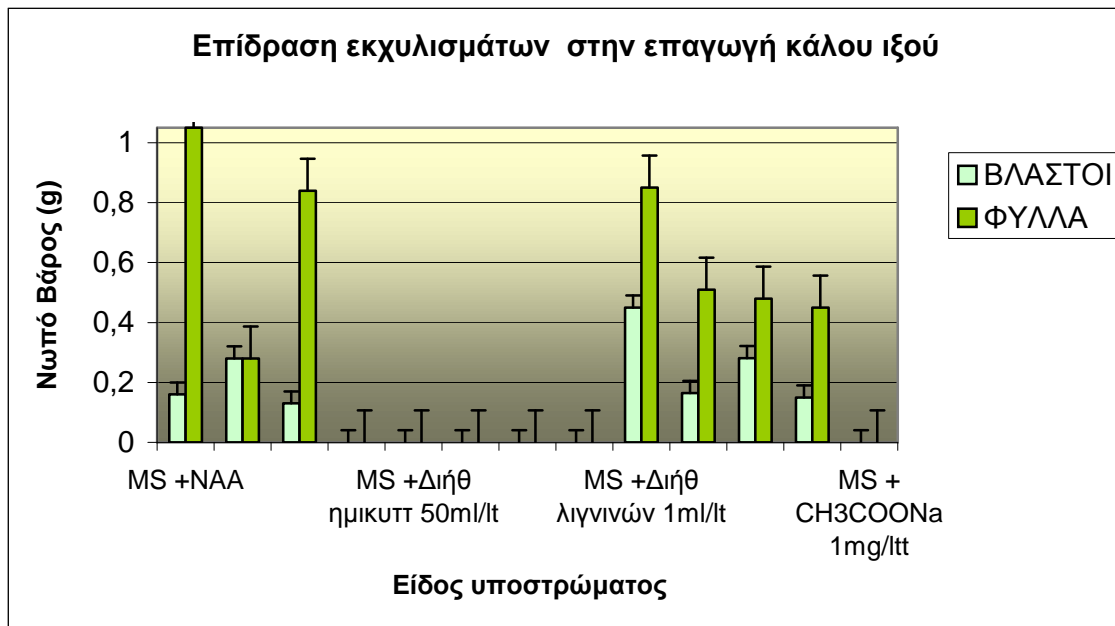
(B X C)	4	0.52925****	1.148086****	0.027549**
(A X B X C)	4	0.61425****	1.411594****	0.022254*
Σφάλμα	480	0.24098****	0.000073	0.003370
Σύνολο	499			

* p < 0.05, ** p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, ns = μη-στατιστικά σημαντική διαφορά

4.2.5. Υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων

Κατά την προσθήκη διάφορων εκχυλισμάτων στο υπόστρωμα εκφύτων ιξού (φύλλων και βλαστών), ανταπόκριση στην επαγωγή κάλων υπήρξε μόνο κατά την προσθήκη διηθήματος λινινών (ουσίας Γ) σε συγκεντρώσεις 1 ml/l και 10 ml/l και CH₃COONa σε συγκεντρώσεις 0.1 g/l και 0.2 g/l. Αντίθετα η προσθήκη διηθήματος ημικυτταρινών (ουσίας Α) και διηθήματος κυτταρινών (ουσίας Β) σε διάφορες συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα, δεν έδωσαν κανένα αποτέλεσμα. Τα ποσοστά για κάθε επέμβαση αναλυτικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 στο Παράρτημα Πινάκων.

Διάγραμμα 13: Ανάπτυξη εκφύτου σε σχέση με το Νωπό Βάρος ανά είδος υποστρώματος (μετρήσεις κατά την τέταρτη εβδομάδα)

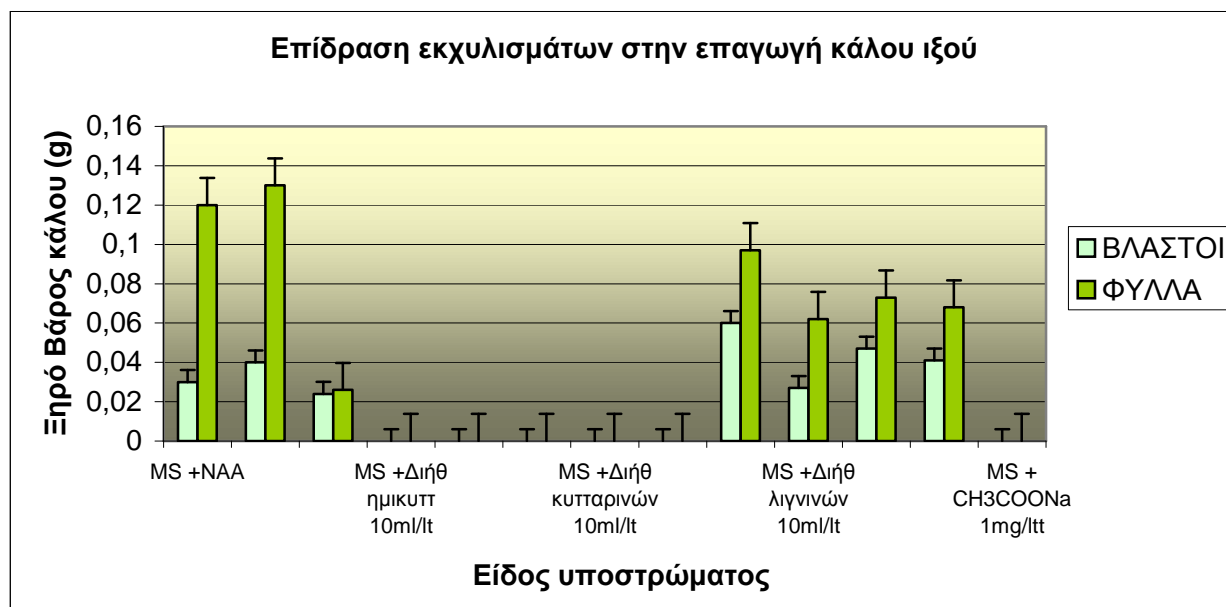


Πίνακας 28.: Ανάλυση διαφορών και F που προκύπτουν από το Νωπό Βάρος κάλων ιξού από έκφυτα βλαστών και φύλλων σε υποστρώματα με την προσθήκη διάφορων εκχυλισμάτων (ημικυτταρινών, κυτταρινών, λινινών και CH₃COONa).

ANOVA						
Πηγή Παραλλακτικότητας	AT	Βαθμοί Ελευθερίας	MT	F	P-value	F crit

Επεμβάσεις	1,771877	12	0,147656	65535	#APIΘ!	#APIΘ!
Υπόλοιπο	0	0	65535			
Σύνολο	1,771877	12				

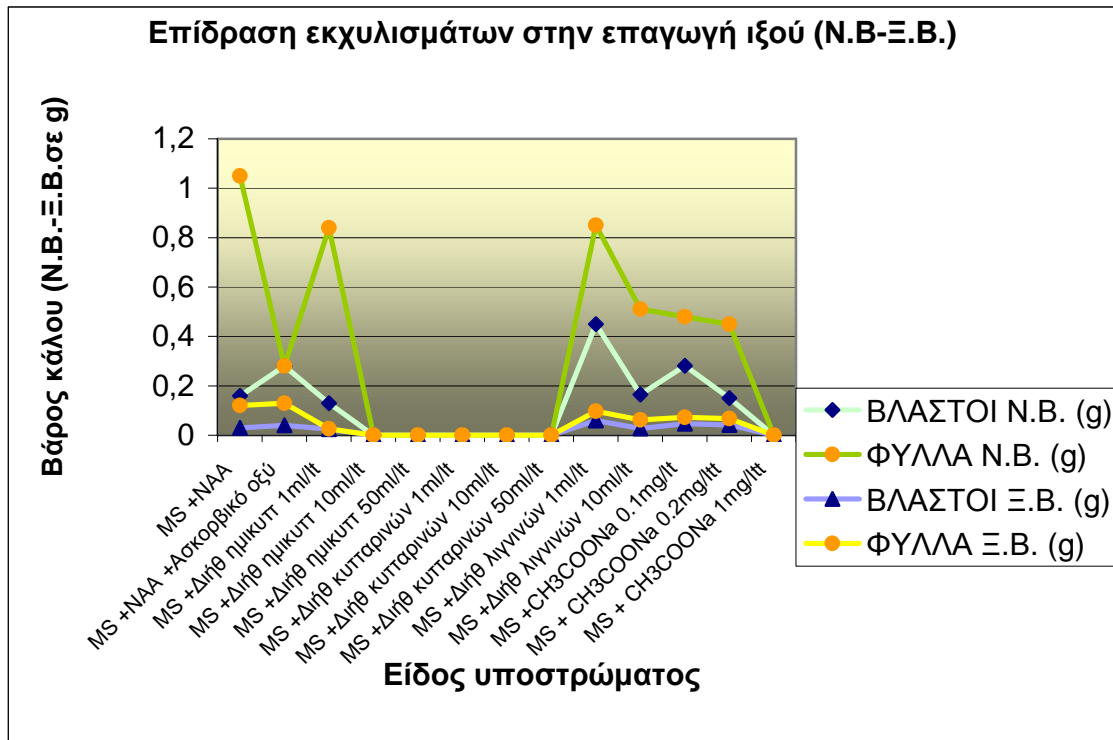
Διάγραμμα 14: Ανάπτυξη εκφύτου σε σχέση με το Ξηρό Βάρος ανά είδος υποστρώματος (μετρήσεις κατά την τέταρτη εβδομάδα)



Πίνακας 30. Ανάλυση διαφορών και F που προκύπτουν από το Ξηρό Βάρος κάλων ιξού από έκφυτα βλαστών και φύλλων σε υποστρώματα με την προσθήκη διαφόρων εκχυλισμάτων (ημικυτταρινών, κυτταρινών, λιγνινών και CH₃COONa).

ANOVA						
Πηγή Παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,029661	12	0,002472	65535	#APIΘ!	#APIΘ!
Υπόλοιπο	0	0	65535			
Σύνολο	0,029661	12				

Διάγραμμα 15: Ανάπτυξη του εκφύτου σε σχέση με Νωπό και Ξηρό Βάρος εκφύτου κατά την τέταρτη εβδομάδα και σύγκριση των τιμών ανά είδος εκφύτου

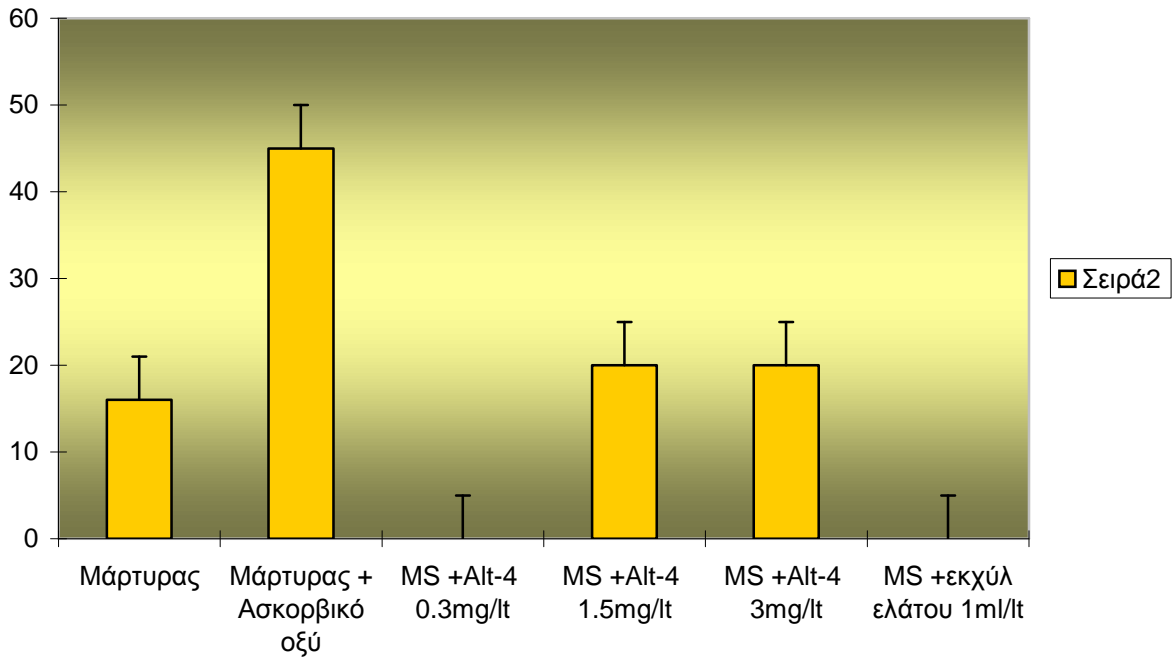


Οι μεγαλύτερες τιμές Νωπού και Ξηρού Βάρους για κάλους προερχόμενους από έκφυτα τόσο φύλλων όσο και βλαστών, αφορούν το υπόστρωμα με την προσθήκη Διηθήματος λιγνινών, οι οποίες όμως δεν ξεπερνούν αυτές των υποστρωμάτων NAA και NAA και ασκορβικού οξέως. Η διαφορά μεταξύ τους δεν είναι στατιστικά σημαντική.

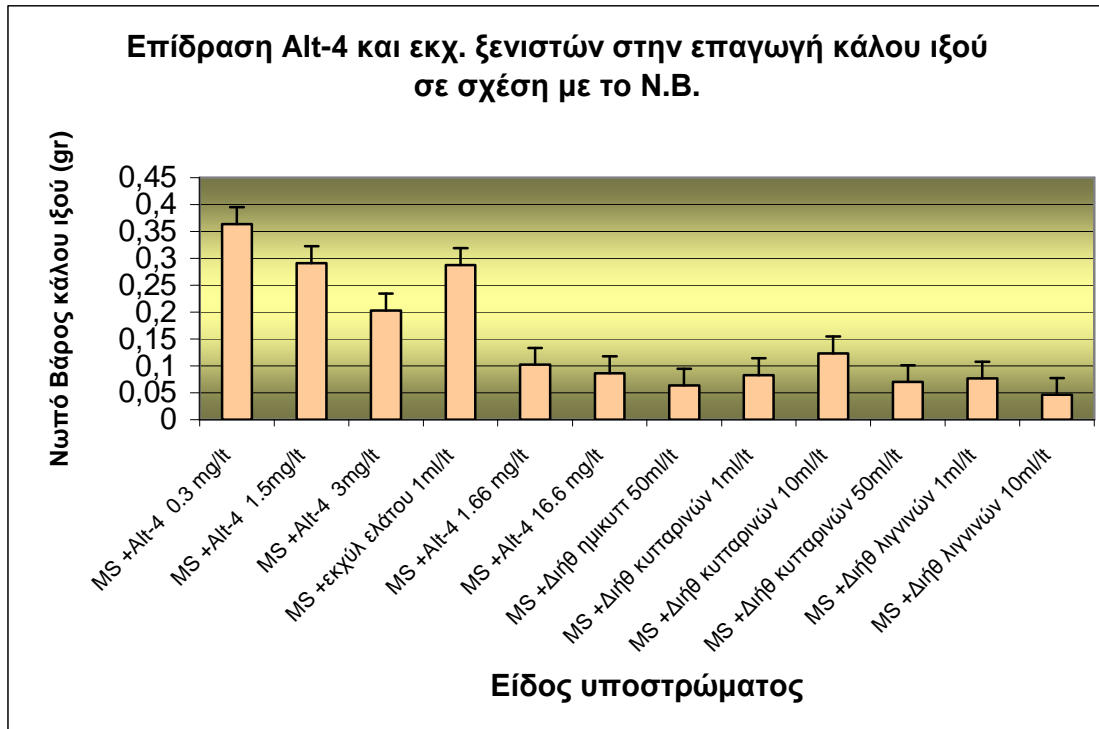
Από τα στοιχεία που προέκυψαν από την ιστοκαλλιέργεια του ιξού με τα συγκεκριμένα υποστρώματα δεν παρατηρήθηκε εμβρυογένεση.

Στα υποστρώματα που προστέθηκαν 4-Αλδοτετραουρονικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις και ουσία E (εκχύλισμα ελάτου, φυσικού ξενιστή του ιξού) υπήρξε καλή ανταπόκριση στην επαγωγή κάλων τόσο για τα έκφυτα φύλλων, όσο και για τα έκφυτα βλαστών με ποσοστά καλογένεσης 13,3% και 20% (Πίνακας 24Α, Παράρτημα Πινάκων).

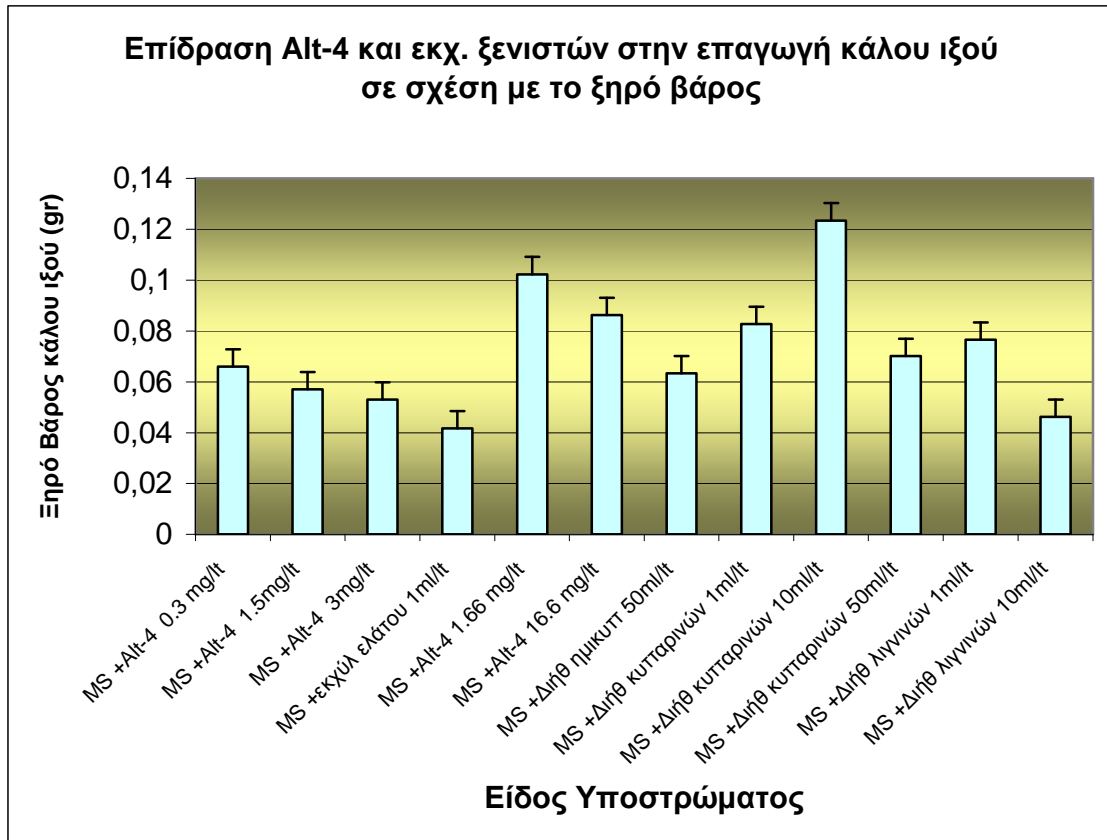
Διάγραμμα 16: Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού)



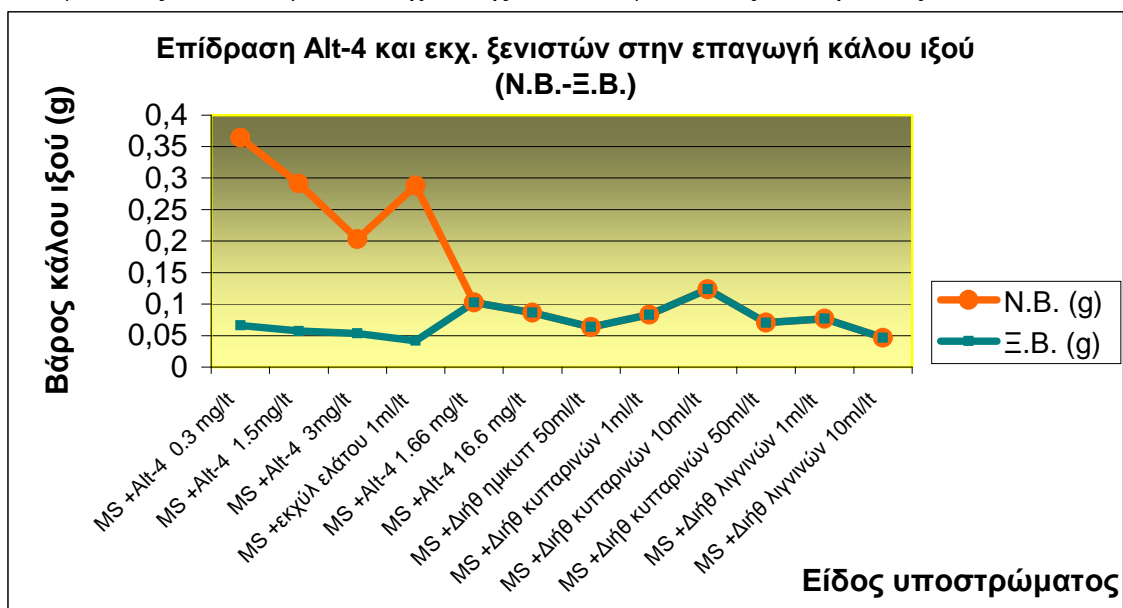
Διάγραμμα 17: Ανάπτυξη κυτταροκαλλιέργειών ιξού σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού) σε σχέση με το Νωπό Βάρος



Διάγραμμα 18: Ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών ιξού σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού) σε σχέση με το Ξηρό Βάρος.



Διάγραμμα 19: Ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών ιξού (νωπό-ξηρό βάρος) σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού).



Οι κάλοι που προέρχονται από το υπόστρωμα με την προσθήκη μικρότερης ποσότητας Al³⁺ (0,3 mg/l) είναι οι περισσότερο αναπτυγμένοι (μεγαλύτερα Νωπά Βάρη), όπως επίσης κι οι κάλοι που προέρχονται από το υπόστρωμα στο οποίο έχει προστεθεί εκχύλισμα ελάτου (Ουσία Ε). Ανάλογη είναι η εικόνα και για τα Ξηρά Βάρη, με εξαίρεση αυτό από το υπόστρωμα ελάτου, όπου το οποίο παρουσιάζεται μικρότερο. Ακόμη, παρατηρείται ότι τα Νωπά και Ξηρά βάρη των κάλων που προέκυψαν από την καλλιέργεια σε υπόστρωμα με εκχύλισμα ξενιστών του φυτού ιξού, συμπίπτουν.

Με βάση τους πίνακες στατιστικής ανάλυσης των παραπάνω δεδομένων, ως τα καλύτερα υποστρώματα για την καλλιέργεια εκφύτων ιξού, επιλέχθηκαν αυτά με την προσθήκη 10 % ασκορβικού οξέος και 1 mg/l NAA στο υπόστρωμα για την καλλιέργεια των φύλλων και των βλαστών. Εστιάζοντας στα ποσοστά καλογένεσης από έκφυτα βλαστών, η προσθήκη 2 mg/l 2,4-D έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, τα οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την προσθήκη 1 mg/l NAA. Επιπλέον, και για την ομοιομορφία των πειραμάτων, επιλέχθηκε και για τους βλαστούς το υπόστρωμα με την προσθήκη 1 mg/l NAA.

Για όλες τις επόμενες επεμβάσεις ακολουθήθηκε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ιστοκαλλιέργειας.

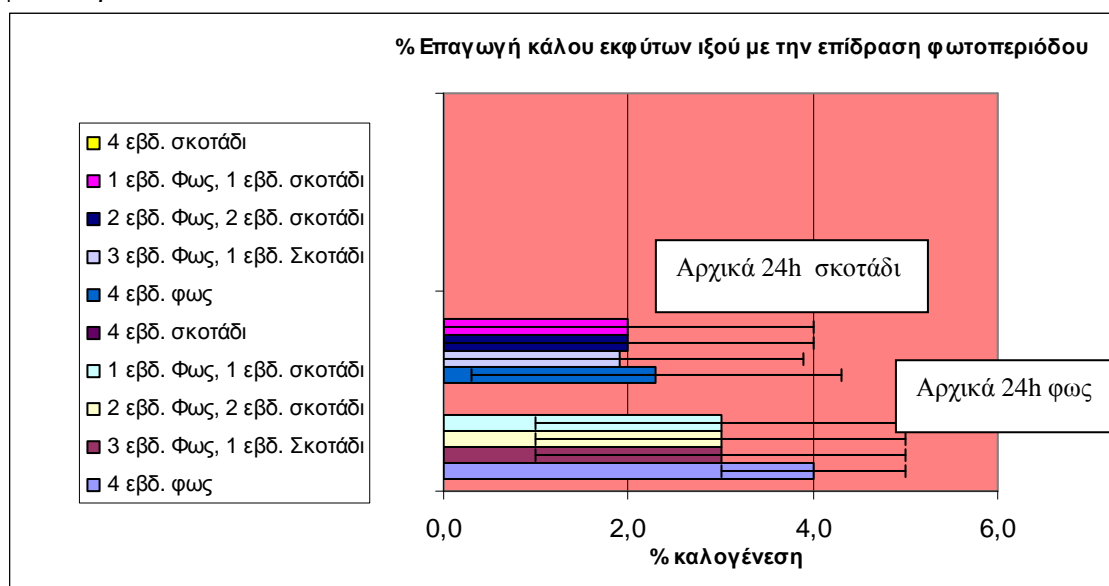
4.2.6. Ανταπόκριση των εκφύτων στην επίδραση της φωτοπεριόδου

Γενικά, οι κάλοι που προήλθαν από το πρώτο εικοσιτετράωρο με φως (Αρχικά 24h φως), εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά καλογένεσης.

Η διαφορά τους δεν είναι στατιστικά σημαντική και η μεταξύ τους συσχέτιση είναι μεγάλη.

Επίσης, στους κάλους που προέρχονται από το πρώτο εικοσιτετράωρο με σκοτάδι, την καλύτερη ανάπτυξη έχουν αυτοί που εκτίθενται στο περισσότερο φως, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά με το ποσοστό καλογένεσης στους κάλους των υπόλοιπων επεμβάσεων.

Διάγραμμα 20: Επαγωγή κάλου % από έκφυτα ιξού μετά από την επίδραση φωτοπεριόδου.



Πίνακας 31. Ανάλυση συσχέτισης των ποσοστών καλογένεσης σε κάλους προερχόμενους από έκφυτα ιξού μετά από την επίδραση φωτοπεριόδου.

	<i>Αρχικά φως (24 ώρες)</i>	<i>Αρχικά σκοτάδι (24 ώρες)</i>
<i>Αρχικά φως (24 ώρες)</i>	1	
<i>Αρχικά σκοτάδι (24 ώρες)</i>	0,990159	1

Πίνακας 32. Ανάλυση των αποτελεσμάτων καλογένεσης που προέκυψαν από έκφυτα ιξού μετά από την επίδραση φωτοπεριόδου.

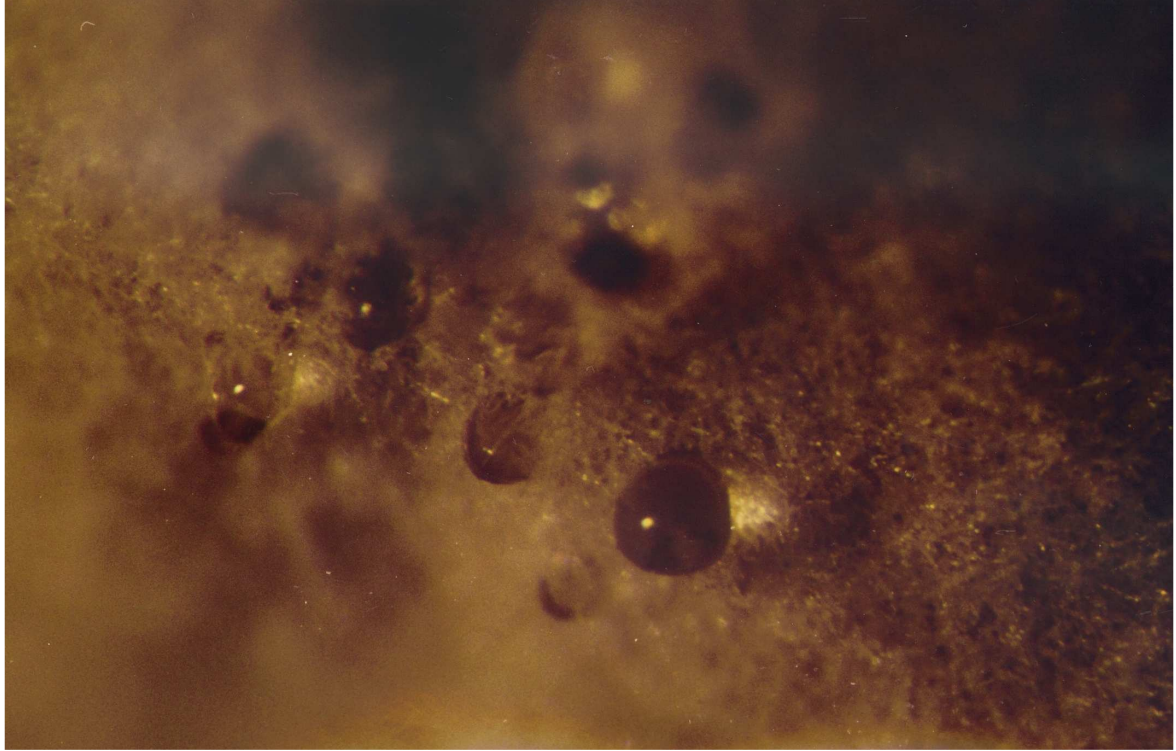
Anova: Single Factor						
ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Επεμβάσεις</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
Αρχικά φως (24 ώρες)	5	13	2,6	2,3		
Αρχικά σκοτάδι (24 ώρες)	5	8,2	1,64	0,863		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	2,304	1	2,304	1,456845	0,261907	5,317645
Υπόλοιπο	12,652	8	1,5815			
Σύνολο	14,956	9				

4.2.7. Σωματική Εμβρυογένεση

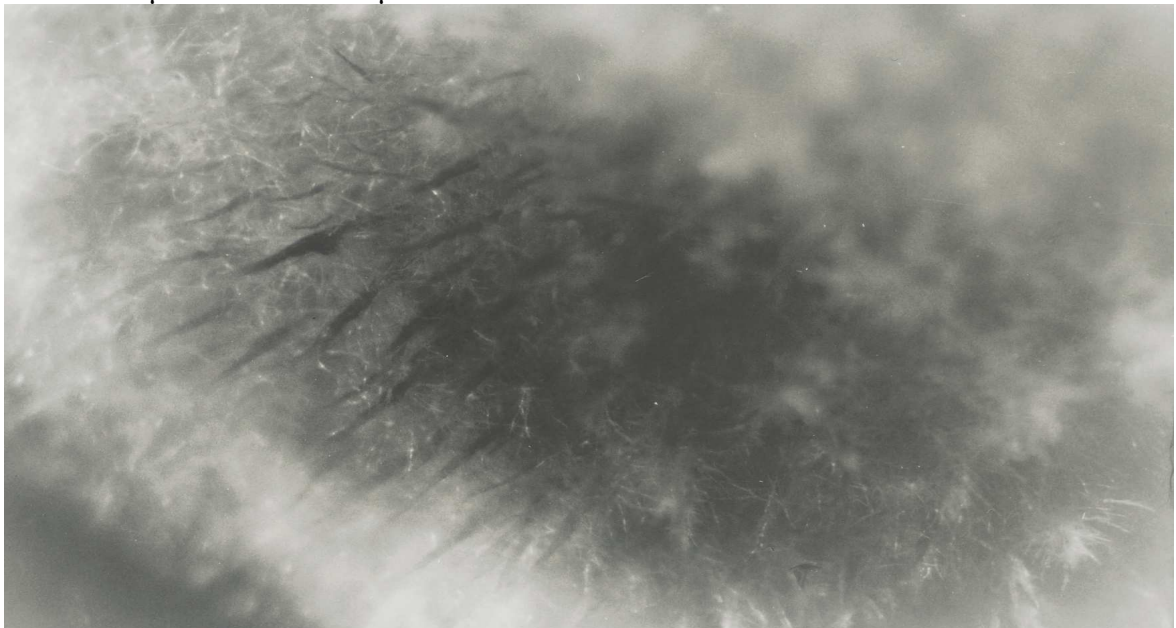
Παρατηρήθηκαν σωματικά έμβρυα στο σφαιρικό στάδιο στις καλλιέργειες κάλων πάνω από 4 εβδομάδες, στο μέσο που περιείχε ασκορβικό οξύ (Εικόνα 7). Η σωματική εμβρυογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού εμβρύου από σωματικούς ιστούς (σπορόφυτα, σποροφυτικά) και περιέχει ένα αριθμό ευκρινών σταδίων π.χ.

τον σχηματισμό των σφαιρικών εμβρύων (προέμβρυα), την περαιτέρω ανάπτυξη του καρδιοσχημου σταδίου, έως το στάδιο της τορπιλακάτου και τελικά το στάδιο της κοτυληδόνας (Torres 1989).

Εικόνα 7.: Λευκό ροζ κάλοι επαγόμενοι από φύλλα ιξού σε MS + 4.95 μ M NAA και καρποφορία σφαιρικών σωματικών εμβρύων σε MS + 4.95 μ M NAA



Εικόνα 8.: Νημάτια σαν ρίζες επαγόμενα από βλαστούς ιξού σε θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μ M NAA + 2.82 μ M BA



4.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

4.3.1. Συσσώρευση επιλεγμένων μακροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού: επίδραση της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου.

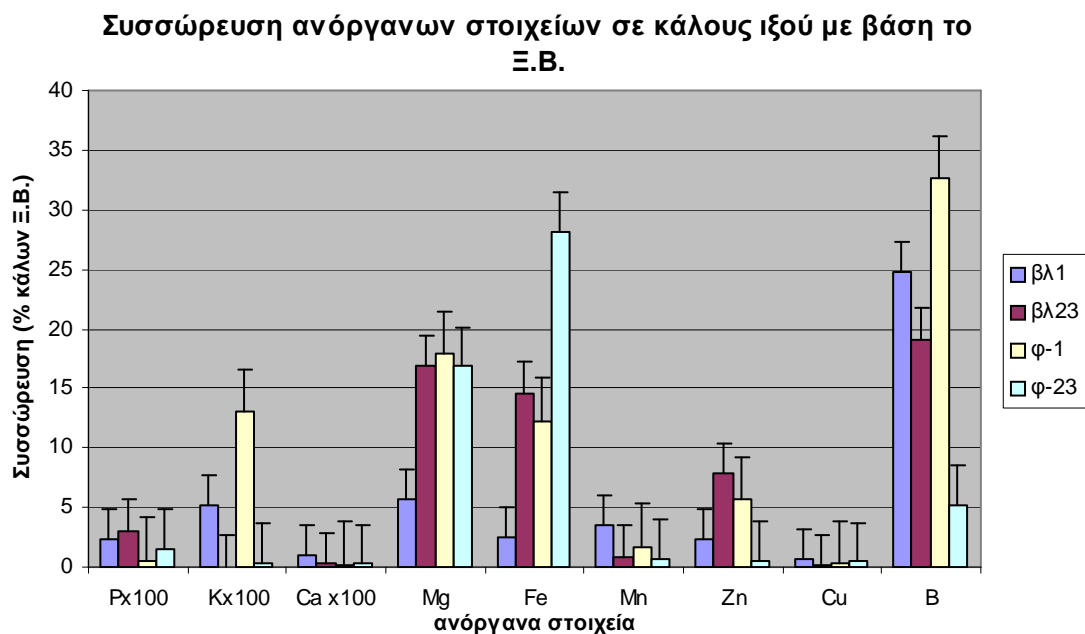
4.3.1.1. Επίδραση των ρυθμιστών ανάπτυξης στην *in vitro* συσσώρευση μακροστοιχείων

Η συσσώρευση του συνόλου των μακροστοιχείων στις καλλιέργειες κάλων ιξού επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από τους ρυθμιστές ανάπτυξης ($p < 0.0001$) και την προέλευση του εκφύτου ($p < 0.05$), όσο και από την αλληλεπίδρασή τους ($p < 0.0001$) (Πίνακας 27).

Παρακάτω ακολουθεί διάγραμμα που περιγράφει την συσσώρευση αυτών των στοιχείων με βάση το ξηρό βάρος (Ξ.Β.) των κάλων σε σχέση με το είδος του εκφύτου (αν προέρχεται από βλαστό-βλ- ή φύλλο-φ-) και το υπόστρωμα που έχει καλλιεργηθεί. Γενικά στα φύλλα παρατηρείται μια συσσώρευση K, Mg, Fe και B, ενώ στους βλαστούς συσσώρευση κυρίως Mg, Fe και B.

Αναλυτικότερα, οι συσχετίσεις ανάλογα με το είδος των ανόργανων στοιχείων, το έκφυτο, το υπόστρωμα και το χρόνο, δίνονται στις ακόλουθες παραγράφους.

Διάγραμμα 21: Συσσώρευση των ανόργανων στοιχείων σε κάλους ιξού (% Ξ.Β.) από έκφυτα φύλλα και βλαστούς, σε διάφορα είδη υποστρωμάτων.



Όπου βλ1, βλ23 έκφυτα που προέρχονται από βλαστούς σε υπόστρωμα ΝΑΑ (1mg/l) και Kin:2,4-D (1:1, 1mg/l) αντίστοιχα και φ-1, φ-23 έκφυτα που προέρχονται από φύλλα στα αντίστοιχα με τους βλαστούς υποστρώματα.

Πίνακας 27: Τα Μέσα Τετράγωνα και το επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης των επεμβάσεων των επιλεγμένων συγκεντρώσεων μακροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλου το ιξού σε απόκριση με τις επεμβάσεις με διαφορετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης και διαφορετική πηγή εκφύτου (φύλλο ή βλαστό).

Παράγοντας Παραλλακτικότητας	B.E	P	K	Ca	Mg
Ρυθμιστής Ανάπτυξης(A)	9	0.000193 ****	0.002267****	0.00205****	3419.679****
Πηγή Εκφύτου (B)	1	0.000285 ***	0.006415*	0.000398*	2367.112*
A x B	9	0.000156 ****	0.002496****	0.001004****	2082.114****
Σφάλμα	280	0.000001	0.000074	0.00003	64.1679

B. E. =Βαθμοί Ελευθερίας, * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$

Όσον αφορά τους προερχόμενους από βλαστούς κάλους, η εφαρμογή 4.65 μM Kin ήταν ανώτερη άλλων Ρυθμιστών Ανάπτυξης επιφέροντας τη μέγιστη *in vitro* συσσώρευση των επιλεγμένων μακροστοιχείων. Επιπροσθέτως, η μέση *in vitro* συσσώρευση μεταλλικών στοιχείων ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από βλαστούς σε σύγκριση με τις καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από φύλλα.

Πίνακας 28: Συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των μακροστοιχείων από καλλιέργειες κάλων ιξού και των επεμβάσεων με τους διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης

Κάλτοι -προερχόμενοι από βλαστό-

	K	P	Ca	Mg
K	1			
P	0.983727	1		
Ca	0.766442	0.791423	1	
Mg	0.986103	0.995975	0.802085	1

Κάλτοι-προερχόμενοι από φύλλο-

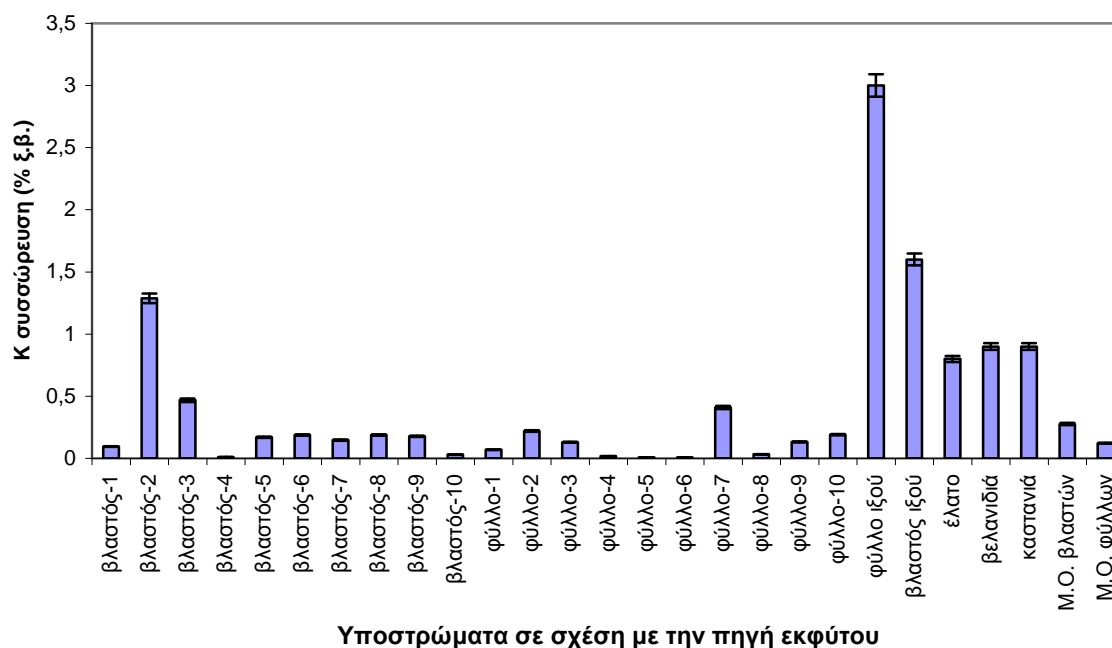
	K	P	Ca	Mg
K	1			
P	0.802689	1		
Ca	0.327683	0.0051	1	
Mg	0.84819	0.599061	0.735849	1

Γενικά στα φύλλα παρατηρείται μια συσσώρευση K, Mg, Fe και B, ενώ στους βλαστούς συσσώρευση κυρίως Mg, Fe και B.

Αναλυτικότερα, η *in vitro* συσσώρευση K ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε φυτά ιξού (Διάγραμμα 21) και μικρότερη από τη συγκέντρωση K σε ξενιστές ιξού, όπως το έλατο, η βελανιδιά και η καστανιά. Τα φυτά ιξού μπορούσαν να συσσωρεύουν K σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τους ξενιστές. Όσον αφορά τις προερχόμενες από φύλλα καλλιέργειες, τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με το συνδυασμό Kin και NAA σε μοριακή αναλογία 1:4 (1-7).

Διάγραμμα 22: Συσσώρευση Καλίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από διάφορα υποστρώματα (ρυθμιστών αύξησης και ξενιστών ιξού)

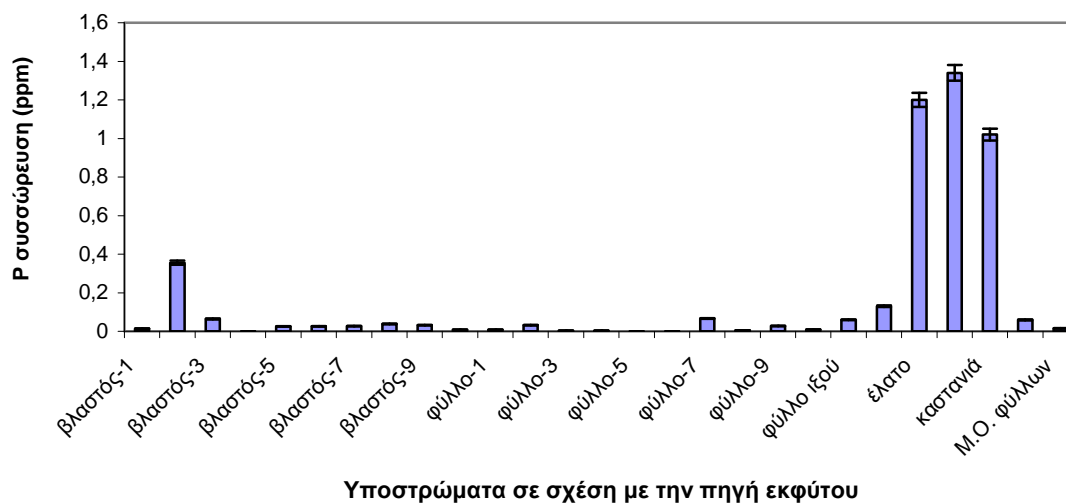
Συσσώρευση καλίου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα



Επίσης, η μέση *in vitro* συσσώρευση P ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε φυτά ιξού και μικρότερη από τη συγκέντρωση P σε ξενιστές ιξού. Εντούτοις, όσον αφορά κάλους προερχόμενους από βλαστούς η εφαρμογή 4.65 μ M Kin δεν ήταν μόνο ανώτερη άλλων ρυθμιστών ανάπτυξης, αλλά υπερτερούσε και έναντι των φυτών ιξού. Όπως και στην περίπτωση της συσσώρευσης K, η υψηλότερη συγκέντρωση P σε καλλιέργειες προερχόμενες από φύλλα παρατηρήθηκε με το συνδυασμό Kin και NAA σε μοριακή αναλογία 1:4 (1-7).

Διάγραμμα 23: Συσσώρευση Φωσφόρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από διάφορα υποστρώματα (ρυθμιστών αύξησης και ξενιστών ιξού)

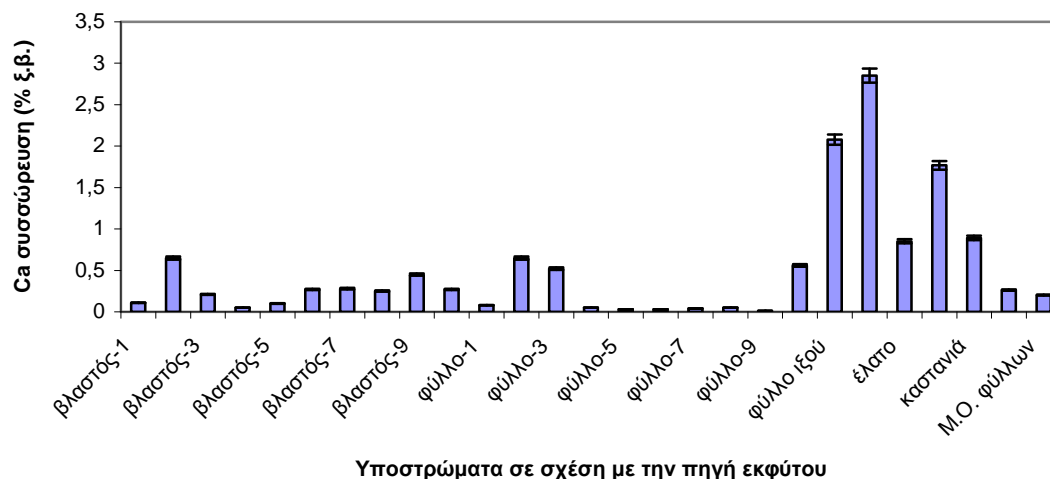
Συσσώρευση φωσφόρου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα



Επίσης, η *in vitro* συσσώρευση Ca ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε φυτά ιξού (Διάγραμμα 23) και μικρότερη από τη συγκέντρωση Ca σε ξενιστές ιξού. Τα φυτά ιξού μπορούσαν να συσσωρεύουν Ca σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τους ξενιστές. Όσον αφορά τις προερχόμενες από φύλλα καλλιέργειες, τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με 4.65 μM Kin, ομοίως δηλαδή με την περίπτωση των προερχόμενων από βλαστούς καλλιεργειών.

Διάγραμμα 24: Συσσώρευση Ασβεστίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από διάφορα υποστρώματα (ρυθμιστών αύξησης και ξενιστών ιξού)

Συσσώρευση Ασβεστίου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα

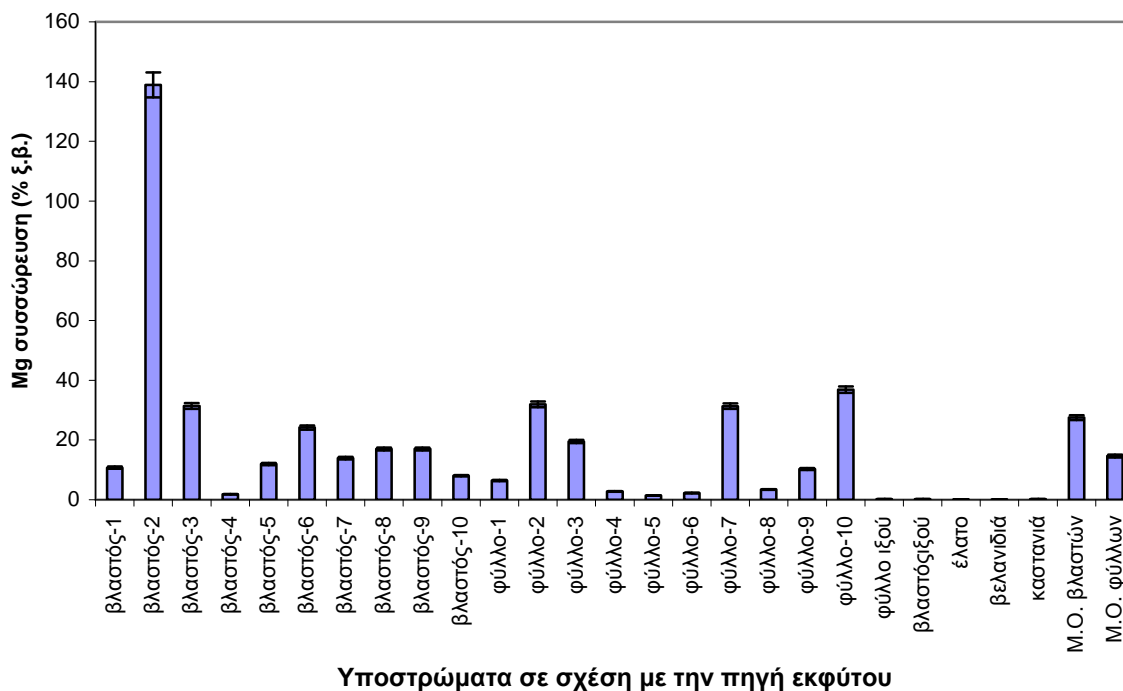


Υποστρώματα σε σχέση με την πηγή εκφύτου

Η *in vitro* συσσώρευση Mg ήταν μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη σε φυτά ιξού (Διάγραμμα 24) και μικρότερη από τη συγκέντρωση Mg σε ξενιστές ιξού (με συγκέντρωση Mg μικρότερη από 0.3% επί ξηρού βάρους). Όσον αφορά τις προερχόμενες από φύλλα καλλιέργειες, τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με το συνδυασμό 4.95 μM NAA και 2.82 μM BA.

Διάγραμμα 25: Συσσώρευση Μαγνησίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από διάφορα υποστρώματα (ρυθμιστών αύξησης και ξενιστών ιξού)

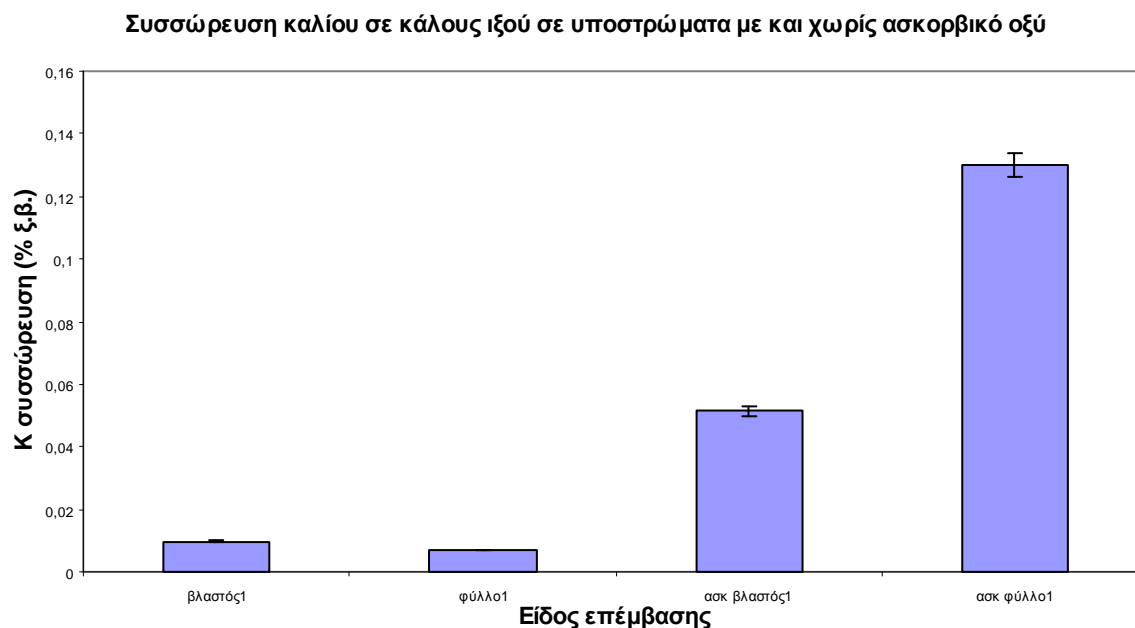
Συσσώρευση Μαγνησίου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα



4.3.1.2. Επίδραση του ασκορβικού οξέος στην *in vitro* συσσώρευση μακροστοιχείων

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο επηρέασε σημαντικά τη συσσώρευση των επιλεγμένων μακροστοιχείων, μαζί με την προέλευση του εκφύτου και την αλληλεπίδρασή τους (Πίνακας 29). Αυτή η συγκεκριμένη επίδραση ήταν διαφορετική για κάθε μακροστοιχείο. Το ασκορβικό οξύ προήγαγε τη συσσώρευση P και Ca σε προερχόμενους από βλαστούς κάλους και τη συσσώρευση K και Mg σε προερχόμενους από φύλλα κάλους (Διαγράμματα 26 – 29).

Διάγραμμα 26: Συσσώρευση Καλίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα χωρίς και με Ασκορβικό Οξύ



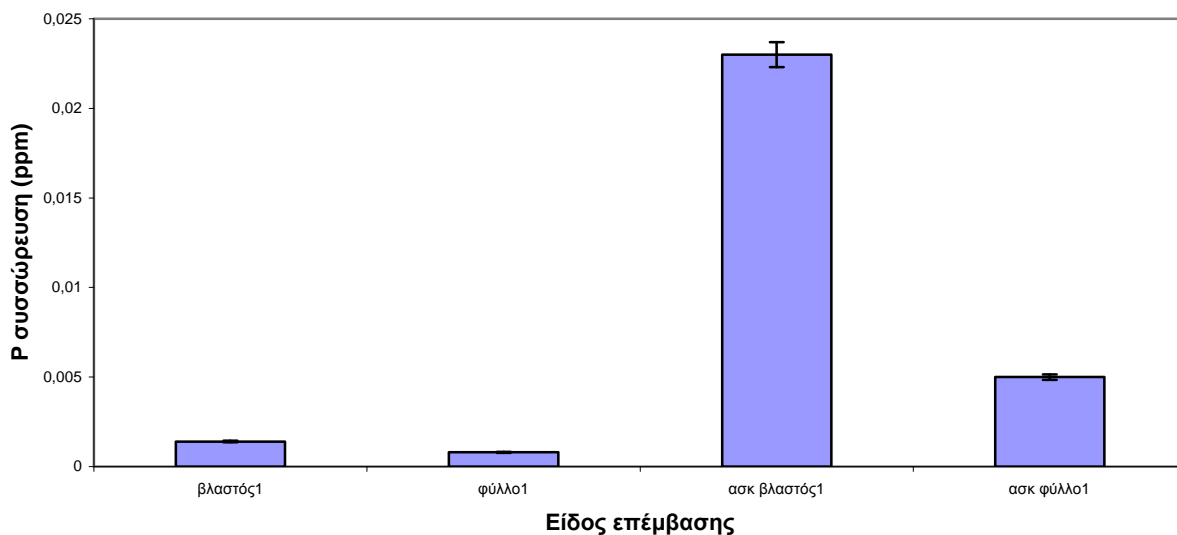
(όπου βλαστός1 και φύλλο1 βλαστοί και φύλλα αντίστοιχα, σε όλα τα διαγράμματα που ακολουθούν και ασκ βλαστός1 και ασκ φύλλο υπόστρωμα βλαστών και υπόστρωμα φύλλων με ασκορβικό, αντίστοιχα).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά την συσσώρευση του Καλίου σε κάλλους ιξού, τόσο προερχόμενους από φύλλα, όσο προερχόμενους κι από βλαστούς, η προσθήκη ασκορβικού οξέος ευνόησε την συσσώρευση και στα δύο είδη κάλων, ενώ η μεγαλύτερη συσσώρευση επιτεύχθηκε στους κάλους που προέρχονταν από φύλλα.

Στο διάγραμμα 27, η συσσώρευση φωσφόρου είναι μεγαλύτερη στους προερχόμενους κάλους από βλαστό σε υπόστρωμα με προσθήκη ασκορβικού οξέος, ενώ η προσθήκη ασκορβικού οξέος ευνόησε και την μεγαλύτερη συσσώρευση φωσφόρου στους κάλους τους προερχόμενους από φύλλα, σε αντίθεση με την συσσώρευσή του φωσφόρου στους κάλους από υποστρώματα χωρίς προσθήκη ασκορβικού οξέος.

Διάγραμμα 27: Συσσώρευση φωσφόρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση φωσφόρου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

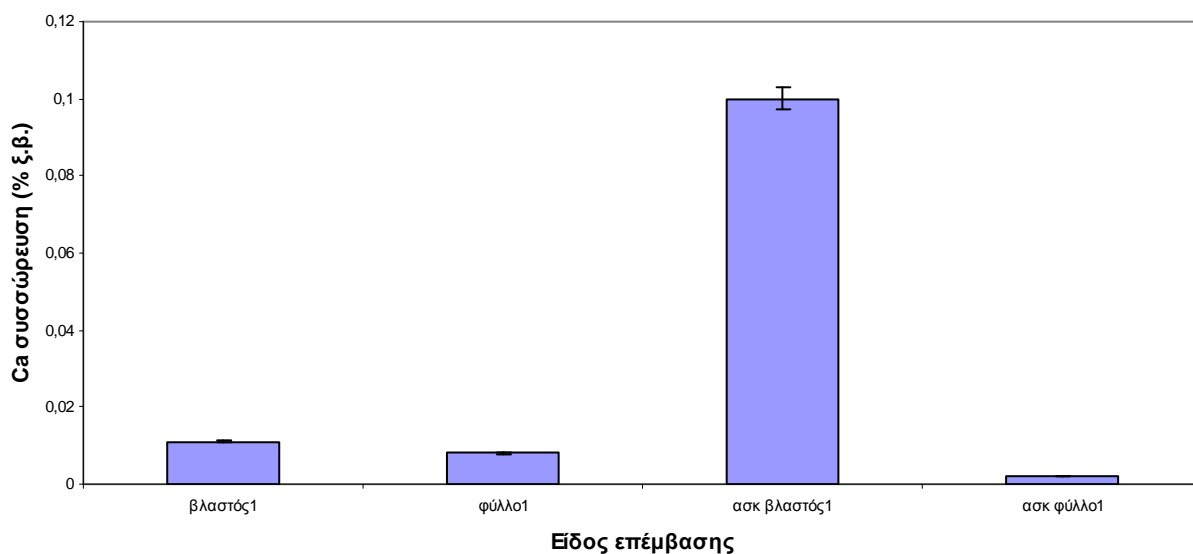


Η συσσώρευση ασβεστίου (Διάγραμμα 28) αυξάνεται στατιστικά σημαντικά όταν στο υπόστρωμα από έκφυτα βλαστού προστίθεται ασκορβικό οξύ, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο για τα έκφυτα από φύλλα.

Γενικά, παρατηρείται μικρή συσσώρευση ασβεστίου σε όλους τους κάλους εκτός εκείνων που προέρχονται από έκφυτα βλαστών με την προσθήκη ασκορβικού οξέος.

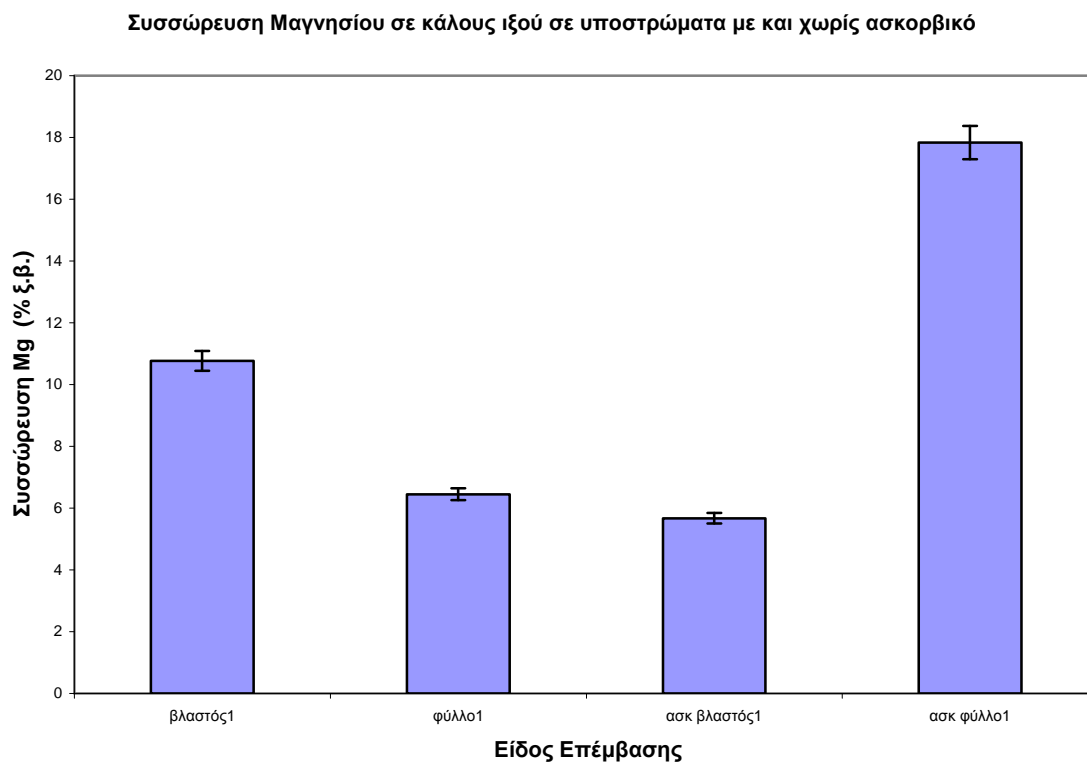
Διάγραμμα 28: Συσσώρευση ασβεστίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση ασβεστίου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Η συσσώρευση μαγνησίου στα υποστρώματα που δεν περιέχουν ασκορβικό οξύ, είναι μεγαλύτερη στους κάλους τους προερχόμενους από βλαστούς, ενώ στα υποστρώματα με ασκορβικό οξύ, είναι μεγαλύτερη στους κάλους τους προερχόμενους από φύλλα.

Διάγραμμα 29: Συσσώρευση μαγνησίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Πίνακας 29: Συσχέτιση μεταξύ των συσσωρευμένων μακροστοιχείων και των συγκεντρώσεων ξηρού βάρους κάλων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια ιξού προερχόμενων από διαφορετικά έκφυτα (βλαστός, φύλλο).

	K	P	Ca	Mg
Έκφυτα Βλαστών	0.860748	0.840828	0.73662	0.883678
Έκφυτα Φύλλων	0.446028	0.398861	0.644118	0.508098

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του Ca σε προερχόμενους από φύλλα κάλους και η συγκέντρωση του Mg σε προερχόμενους από βλαστούς κάλους ελαττώθηκαν μετά την προσθήκη του ασκορβικού οξέος.

Πίνακας 30: Τα Μέσα Τετράγωνα και το επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης των επεμβάσεων των επιλεγμένων συγκεντρώσεων μακροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλου το ιξού σε απόκριση στις επεμβάσεις με Ασκορβικό Οξύ (10 mg L^{-1}) και διαφορετική πηγή εκφύτου (φύλλο ή βλαστό).

Παράγοντας Παραλλακτικότητας	B.E.	P	K	Ca	Mg
Προσθήκη Ασκορβικού Οξέος (A)	1	0.00049*	0.020396*	0.005163*	29.6564*
Πηγή Εκφύτου (B)	1	0.000259*	0.004344*	0.007605*	46.1019*
A x B	1	0.000227*	0.004981*	0.006774*	203.7365*
Σφάλμα	36	0.000023	0.000174	0.000204	6.111402

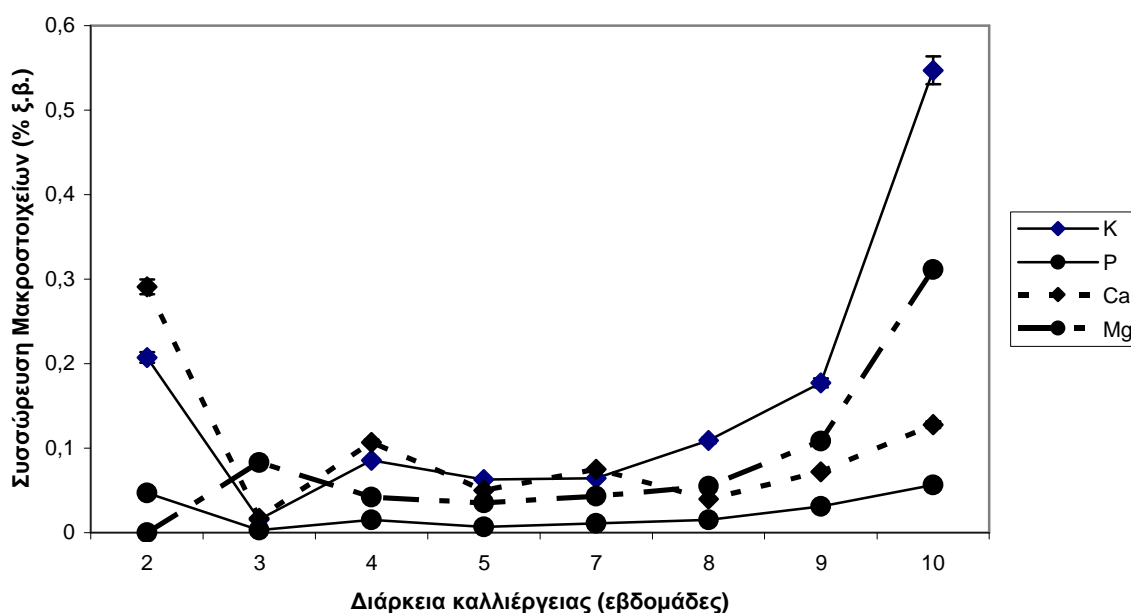
B.E. =Βαθμοί Ελευθερίας, * = $p < 0.05$

4.3.1.3. Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας στην *in vitro* συσσώρευση μακροστοιχείων

Οι προερχόμενες από βλαστούς καλλιέργειες ιξού παρουσίασαν ένα μοτίβο διακύμανσης της συσσώρευσης μακροστοιχείων κατά τη διάρκεια συνολικής περιόδου επώασης δέκα εβδομάδων σε καλλιεργητικό μέσο MS εμπλουτισμένο με 4.95 μM NAA, με μια αυξητική τάση μετά την όγδοη εβδομάδα (Διάγραμμα 30). Εντούτοις, η παρατηρούμενη συσχέτιση μεταξύ της επώασης και των επιλεγμένων μακροστοιχείων και των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους ήταν μικρή (Πίνακας 31). Η συγκέντρωση της συνολικής διαλελυμένης πρωτεΐνης παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια των πρώτων πέντε εβδομάδων, αλλά στη συνέχεια δεκαπλασιάστηκε. Κατά αυτόν τον τρόπο, για την *in vitro* συσσώρευση πρωτεΐνης δεν υπάρχει προφανής συσχέτιση με τη συσσώρευση μακροστοιχείων.

Διάγραμμα 30: Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας κάλων ιξού στη συσσώρευση μακροστοιχείων

Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας κάλων ιξού στη συσσώρευση Μακροστοιχείων



Πίνακας 31: Συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας της επώασης της καλλιέργειας και των επιλεγμένων μακροστοιχείων και των συγκεντρώσεων Ξηρού Βάρους σε κάλους προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια βλαστού του ιξού.

	K	P	Ca	Mg	Ξ.Β.
Διάρκεια Καλλιέργειας	0.54669	0.314226	-0.33852	0.681574	0.302016

4.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

4.4.1. Επίδραση της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου στο σχήμα κατανομής επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού.

4.4.1.1. Επίδραση της προσθήκης ρυθμιστών της φυτικής ανάπτυξης στη συγκέντρωση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro

Η συσσώρευση Mn, Zn, Cu και B σε καλλιέργειες κάλου ιξού επηρεαζόταν σημαντικά τόσο από την προσθήκη διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης ($p < 0.0001$) και την προέλευση του εκφύτου ($p < 0.05$), όσο και από την αλληλεπίδρασή τους ($p < 0.0001$). Ωστόσο, κανένας από αυτούς τους παράγοντες δεν επηρέασε σε βαθμό στατιστικά σημαντικό τη συσσώρευση Fe (Πίνακας 32).

Η μέση συγκέντρωση Fe, Mn, Zn και Cu in vitro ήταν υψηλότερη στις καλλιέργειες κάλου από βλαστούς σε σύγκριση με τις καλλιέργειες κάλου από φύλλα και πολύ υψηλότερη σε σχέση με φυτά ιξού (Διαγράμματα 31-35) και προσβεβλημένα από ξύο κλαδιά ξενιστών, όπως το έλατο, η δρυς και η καστανιά (με συγκεντρώσεις μικροδιατροφικών παραγόντων γενικά μικρότερες από το 0.008% του ξηρού βάρους).

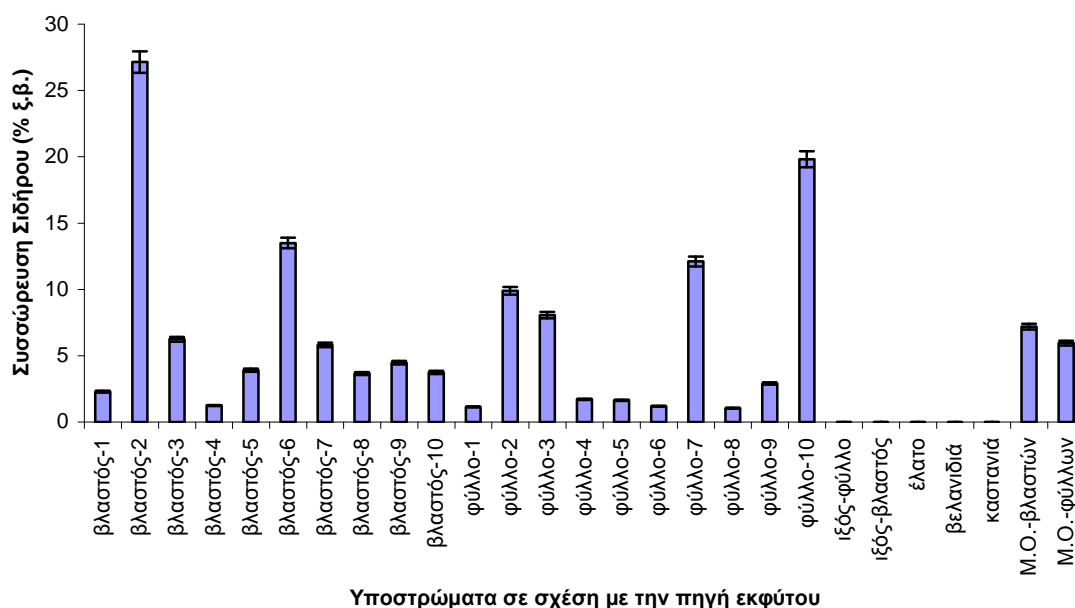
Πίνακας 32: Τα Μέσα Τετράγωνα και το επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης των επεμβάσεων των επιλεγμένων συγκεντρώσεων μικροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλου το ιξού σε απόκριση με τις επεμβάσεις με διαφορετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης και διαφορετική πηγή εκφύτου (φύλλο ή βλαστό).

Παράγοντας Παραλλακτικότητας	B.E	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Ρυθμιστής Ανάπτυξης(A)	9	287.3829 ⁿ _s	57.64714* ***	30.29212** **	0.156769****	262.1656****
Πηγή Εκφύτου (B)	1	62.2670 ^{ns}	85.85348*	15.21084*	0.220476*	178.7813*
A x B	9	265.8829 ⁿ _s	38.61094* ***	8.87123*** *	0.171066****	310.1186****
Σφάλμα	280	169.0488	1.158327	0.266145	0.005276	6.881522

B. E. = Βαθμοί Ελευθερίας, * = $p < 0.05$, **** = $p < 0.0001$, ns= μη-στατιστικά σημαντική διαφορά

Διάγραμμα 31: Συσσώρευση σιδήρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση Σιδήρου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα

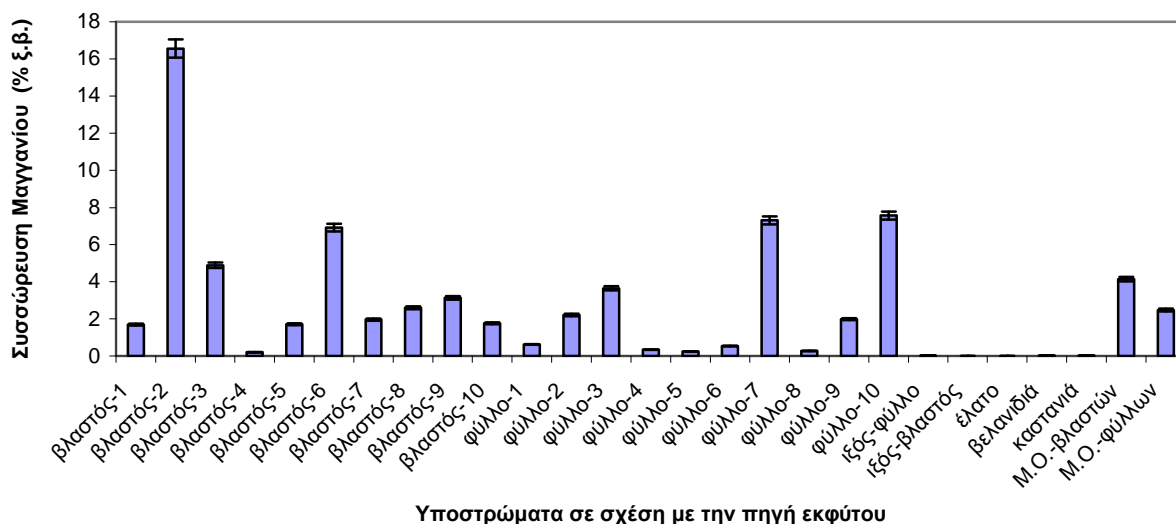


Υποστρώματα σε σχέση με την πηγή εκφύτου

Για τους κάλους από βλαστούς και με την εξαίρεση του Β, η προσθήκη 4.65 mM Kin ήταν ανώτερη από τους άλλους ρυθμιστές ανάπτυξης, οδηγώντας στη μέγιστη *in vitro* συσσώρευση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων.

Διάγραμμα 32: Συσσώρευση μαγγανίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση Μαγγανίου σε ξενιστές και κάλους ιξού σε διάφορα υποστρώματα



Υποστρώματα σε σχέση με την πηγή εκφύτου

Για τις καλλιέργειες με έκφυτα φύλλων οι μέγιστες συγκεντρώσεις Fe και Mn επετεύχθησαν με 4.95 mM NAA + 2.82 mM BA. Η μέγιστη συγκέντρωση Zn

παρατηρήθηκε με 4.65 mM K_{in} και η μέγιστη συγκέντρωση Cu με συνδυασμό NAA και K_{in} σε γραμμομοριακή σχέση 1 : 4.7.

Διάγραμμα 33: Συσσώρευση ψευδαργύρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

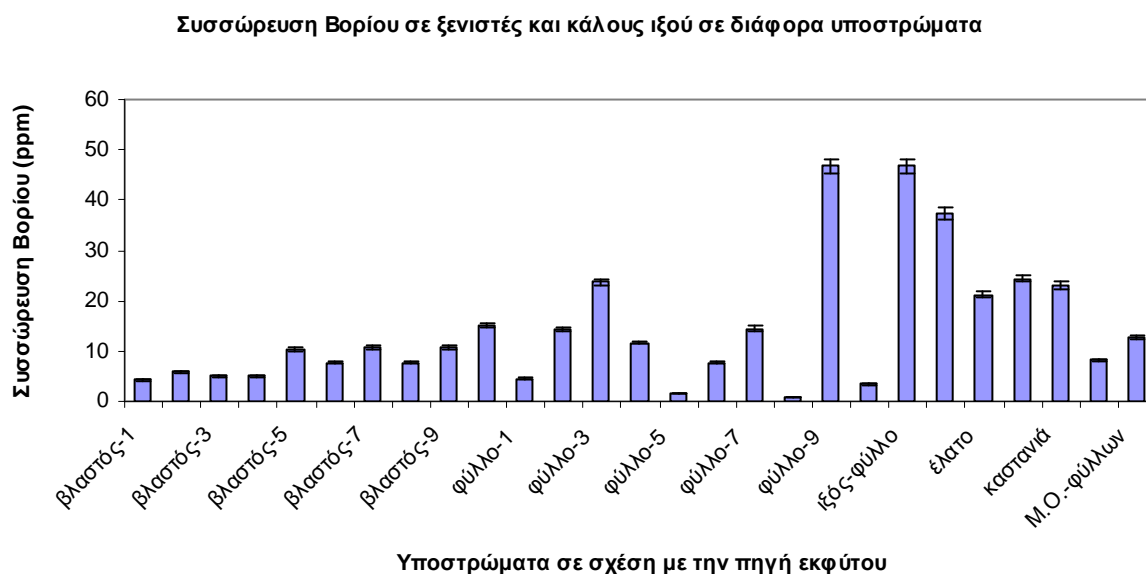


Η μέση παρατηρηθείσα περιεκτικότητα των καλλιεργειών ιξού σε Fe βρισκόταν πολύ πάνω από το γενικώς αποδεκτό κρίσιμο επίπεδο έλλειψης 2% (ξηρού βάρους) για ταχέως αναπτυσσόμενους μεριστωματικούς και επεκτεινόμενους ιστούς (Haussling et al, 1985).

Διάγραμμα 34: Συσσώρευση χαλκού σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Διάγραμμα 35: Συσσώρευση βορίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Η μέση συγκέντρωση Β ήταν μικρότερη *in vitro* από ό,τι στα φυτά ιξού (Διάγραμμα 35) και μικρότερη από τη συγκέντρωση Β στους ξενιστές του ιξού. Η μέση συγκέντρωση Β στις καλλιέργειες κάλου από βλαστούς ήταν χαμηλότερη από ό,τι στις καλλιέργειες με έκφυτα φύλλων. Είναι πιθανό αυτό το αποτέλεσμα να αποτελεί άμεση συνέπεια της υψηλής συγκέντρωσης Β στα φύλλα του ιξού. Η μέγιστη συγκέντρωση Β *in vitro* παρατηρήθηκε είτε με συνδυασμό NAA και K_{in} σε γραμμομοριακή σχέση 1 : 4.7 (έκφυτα βλαστών) ή με 4.95 mM NAA + 1.41 mM BA (έκφυτα φύλλων). Ο τελευταίος συνδυασμός ήταν ανώτερος όχι μόνο από τους άλλους ρυθμιστές ανάπτυξης, αλλά και από τα ίδια τα φυτά ιξού καθώς και τα είδη-ξενιστές. Τέλος, τα φυτά ιξού συσσωρεύουν το Β σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα είδη-ξενιστές.

Εκτός από το Β, η συσσώρευση των μικροδιατροφικών παραγόντων σε καλλιέργειες κάλου από έκφυτα βλαστών συσχετιζόταν ισχυρά με τη συγκέντρωση επί του ξηρού βάρους (Πίνακας 33). Αντιθέτως, καμία τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες κάλου από έκφυτα φύλλων.

Πίνακας 33: Συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των μικροστοιχείων από καλλιέργειες κάλων ιξού και των επεμβάσεων με τους διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης (PGR treatments).

Κάλοι -προερχόμενοι από βλαστό

	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Fe	1				
Mn	0.931997	1			
Zn	0.914492	0.991187	1		
Cu	0.910275	0.984695	0.991592	1	
B	-0.14501	-0.26732	-0.18919	-0.20005	1

Κάλοι-προερχόμενοι από φύλλο

	Fe	Mn	Zn	Cu	B

Fe	1				
Mn	0.416537	1			
Zn	0.355337	0.571722	1		
Cu	0.416537	0.926077	0.65719	1	
B	0.279464	0.098188	0.167794	-0.02433	1

Σε τυλώδη ιστό προερχόμενο από βλαστούς, παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις Fe, Mn, Zn και Cu, ενώ η συσσώρευση B συσχετιζόταν ασθενώς αρνητικά με τους άλλους μικροδιατροφικούς παράγοντες (Πίνακας 34). Αντιθέτως, σε καλλιέργειες προερχόμενες από φύλλα, παρατηρήθηκε υψηλή θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ των συγκεντρώσεων Mn και Cu.

Πίνακας 22: Τα Μέσα Τετράγωνα και το επίπεδο σημαντικότητας της ανάλυσης των επεμβάσεων των επιλεγμένων συγκεντρώσεων μικροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλου του ιξού σε απόκριση με τις επεμβάσεις με Ασκορβικό Οξύ (10 mg L^{-1}) και διαφορετική πηγή εκφύτου (φύλλο ή βλαστό).

Παράγοντας Παραλλακτικότητας	B.E.	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Προσθήκη Ασκορβικού Οξέος (A)	1	96.99179*	6.032455*	27.13336*	0.275427*	1762.515*
Πηγή Εκφύτου (B)	1	55.85767*	5.998471*	6.91844*	0.078732*	49.220*
A x B	1	89.76270*	0.354939*	9.46679*	0.186003*	43.263*
Error	36	2.692881	0.010640	0.283237	0.005580	1.29926

B. E. = Βαθμοί Ελευθερίας, * = $p < 0.05$

4.4.1.2. Επίδραση του ασκορβικού οξέος στη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στο καλλιεργητικό μέσο επηρέασε σημαντικά τη συσσώρευση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων, μαζί με την προέλευση του εκφύτου και την αλληλεπίδραση των μικροδιατροφικών παραγόντων (Πίνακας 35).

Πίνακας 35: Συσχέτιση μεταξύ των συσσωρευμένων μικροστοιχείων και των συγκεντρώσεων ξηρού βάρους κάλων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια ιξού προερχόμενων από διαφορετικά έκφυτα (βλαστός, φύλλο).

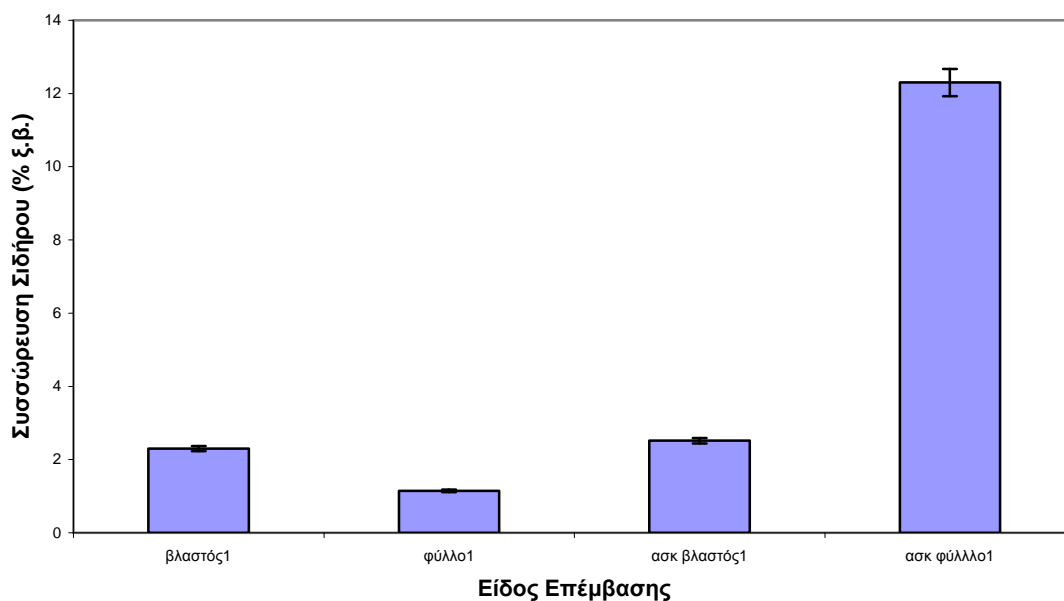
	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Έκφυτα Βλαστών	0.967355	0.883678	0.953433	0.955651	-0.27229
Έκφυτα Φύλλων	0.253303	0.103907	0.861139	0.272634	0.179687

Η συγκεκριμένη επίδραση διέφερε για κάθε μικροδιατροφικό παράγοντα. Το ασκορβικό οξύ γενικά προήγαγε τη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων τόσο στις καλλιέργειες από βλαστούς όσο και σε εκείνες από φύλλα.

Ωστόσο, η συσσώρευση Mn και Cu αυξήθηκε ιδιαίτερα στις καλλιέργειες από βλαστούς, ενώ οι συγκεντρώσεις των Fe, Zn και B αυξήθηκαν ιδιαίτερα στις καλλιέργειες από φύλλα (Διαγράμματα 36-40).

Διάγραμμα 36: Συσσώρευση σιδήρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

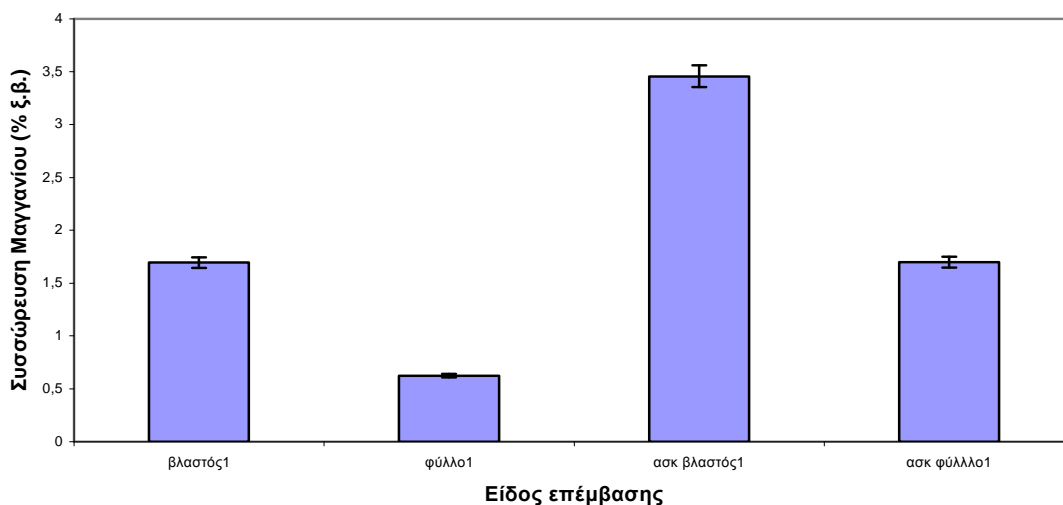
Συσσώρευση σιδήρου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Αναλυτικότερα, η μεγαλύτερη συσσώρευση σιδήρου παρατηρήθηκε στους κάλους προερχόμενους από φύλλα σε υπόστρωμα με ασκορβικό οξύ, ενώ η συσσώρευση στα υπόλοιπα υποστρώματα (με ή χωρίς ασκορβικό οξύ) δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διακυμάνσεις μεταξύ τους.

Διάγραμμα 37: Συσσώρευση μαγγανίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

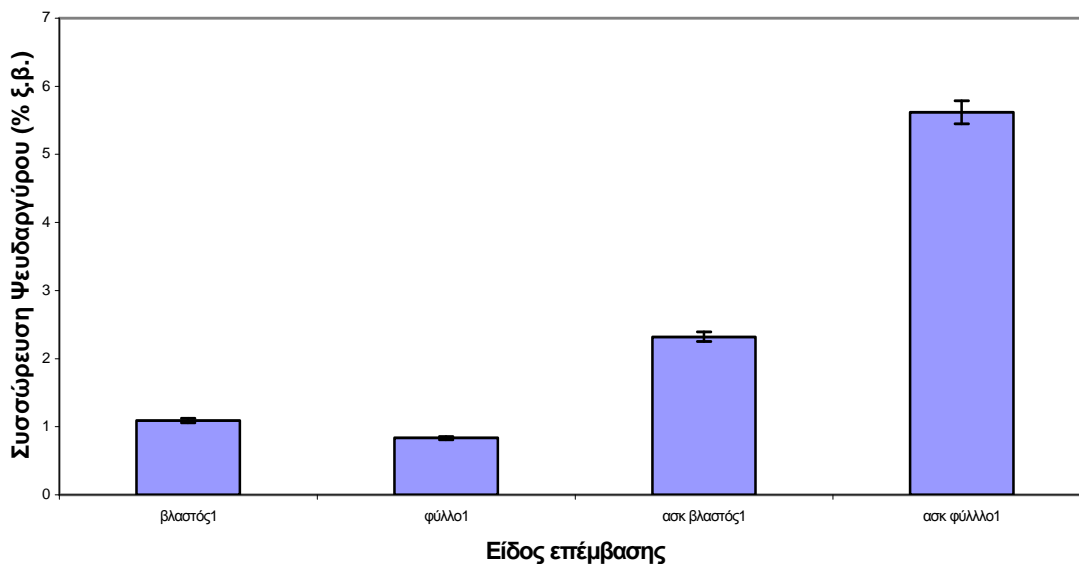
Συσσώρευση Μαγγανίου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Η μεγαλύτερη συσσώρευση μαγγανίου σημειώθηκε σε κάλους από βλαστό σε υπόστρωμα με ασκορβικό οξύ, ενώ η προθήκη ασκορβικού οξέος στα υποστρώματα εκφύτων φύλλων βοήθησε στην μεγαλύτερη συσσώρευση μαγγανίου σε σύγκριση με τα υποστρώματα χωρίς.

Διάγραμμα 38: Συσσώρευση ψευδαργύρου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

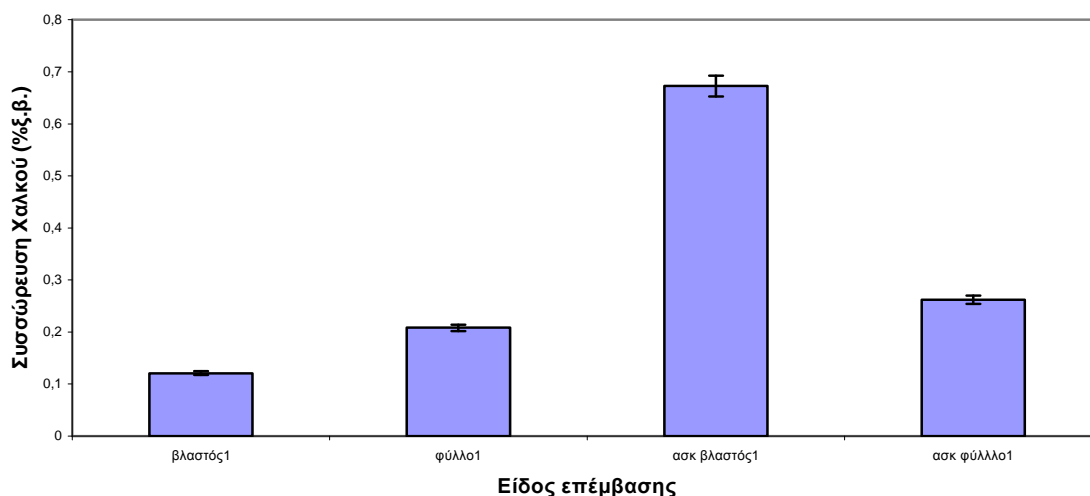
Συσσώρευση Ψευδαργύρου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Η μεγαλύτερη συσσώρευση ψευδαργύρου σημειώθηκε στους κάλους τους προερχόμενους από έκφυτα φύλλων καλλιεργούμενων σε υπόστρωμα με την προσθήκη ασκορβικού οξέος.

Διάγραμμα 39: Συσσώρευση χαλκού σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση Χαλκού σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

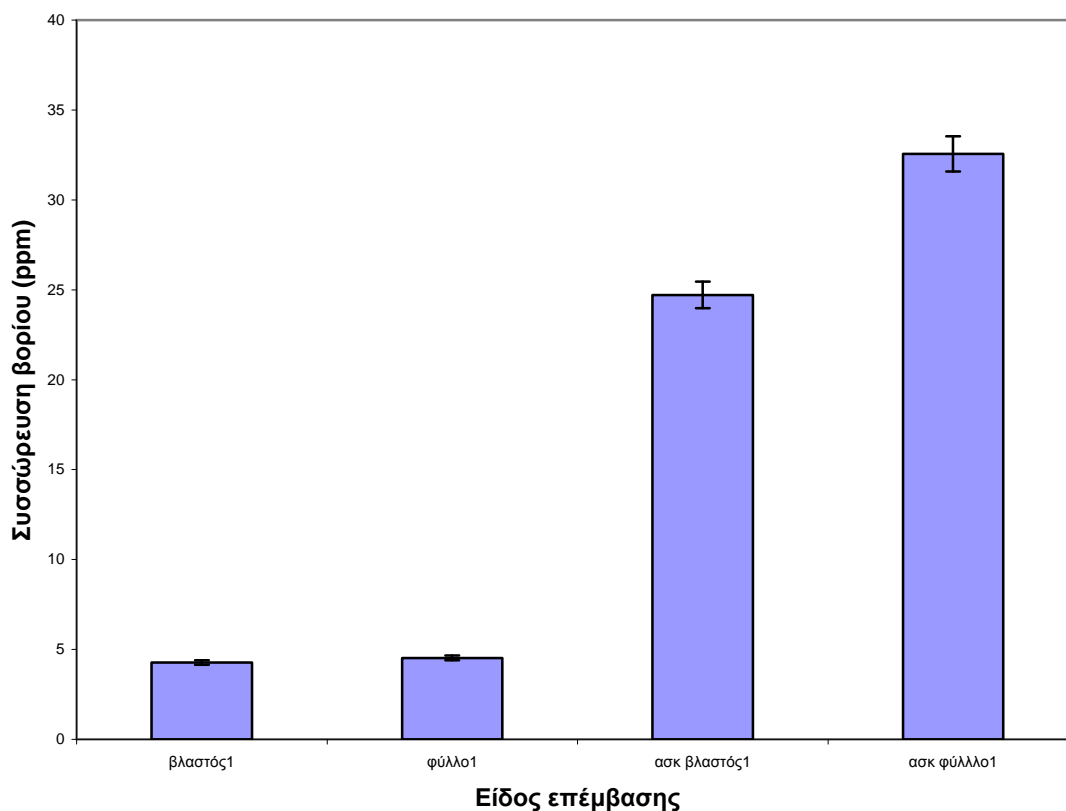


Η μεγαλύτερη συσσώρευση χαλκού σημειώθηκε στους κάλους που προήλθαν από καλλιέργειες βλαστών σε υπόστρωμα με προσθήκη ασκορβικού οξέος. Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στα υποστρώματα με φύλλα δεν έδωσαν μεγαλύτερη συσσώρευση χαλκού.

Στην συσσώρευση βορίου, η προσθήκη ασκορβικού οξέος παίζει σημαντικό ρόλο, αφού αυξάνει την συσσώρευση βορίου στους κάλους που προέρχονται από τα συγκεκριμένα υποστρώματα, είτε αυτοί προέρχονται από φύλλα είτε προέρχονται από βλαστούς. Η μεγαλύτερη συσσώρευση βορίου στους κάλους από φύλλα και υποστρώματα με την προσθήκη ασκορβικού οξέος.

Διάγραμμα 40: Συσσώρευση βορίου σε κάλους ιξού (φύλλα και βλαστοί) προερχόμενους από υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ

Συσσώρευση βορίου σε κάλους ιξού σε υποστρώματα με και χωρίς ασκορβικό οξύ



Γενικά, παρατηρείται ότι το ασκορβικό οξύ ευνόησε τη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων λόγω ενίσχυσης της ανάπτυξης κάλου (Πίνακας 34).

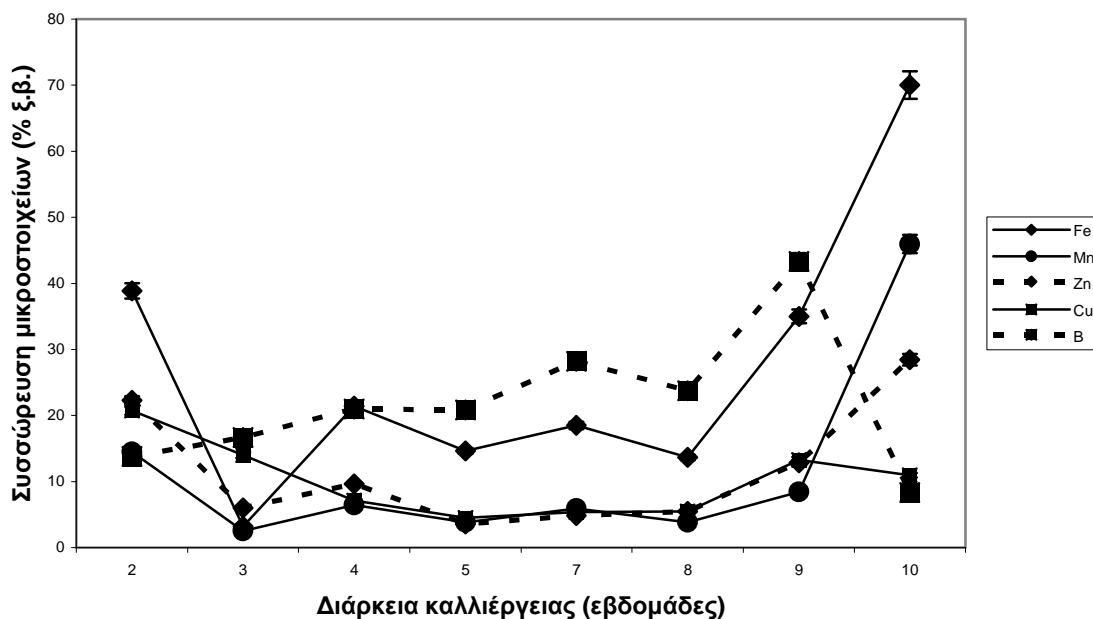
4.4.1.3. Επίδραση της διάρκειας καλλιέργειας στη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro

Οι προερχόμενες καλλιέργειες από βλαστούς κάλου παρουσίασαν ένα μεταβαλλόμενο σχήμα συσσώρευσης μικροδιατροφικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της περιόδου επώασης συνολικά 10 εβδομάδων σε MS + 4.95 mM NAA, με αυξητική τάση μετά την όγδοη εβδομάδα (Διάγραμμα 41). Εξαίρεση αποτέλεσε η μείωση της συσσώρευσης B μετά την ένατη εβδομάδα καλλιέργειας. Ωστόσο, η παρατηρηθείσα συσχέτιση ανάμεσα στην επώαση και τις συγκεντρώσεις των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων ήταν ασθενής (Πίνακας 36).

Η συγκέντρωση της συνολικής διαλυτής πρωτεΐνης στον τυλώδη ιστό παρέμεινε σταθερή κατά τις πρώτες πέντε εβδομάδες επώασης, αλλά αυξήθηκε στο δεκαπλάσιο ακολούθως. Έτσι, η συσσώρευση πρωτεΐνης in vitro δεν φαινόταν να συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των μικροδιατροφικών παραγόντων.

Διάγραμμα 41: Επίδραση της διάρκειας καλλιέργειας στην συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων in vitro

**Επίδραση της διάρκειας της καλλιέργειας κάλων ιξού στη συσσώρευση
μικροστοιχείων**



Πίνακας 36: Συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας της επώασης της καλλιέργειας και των επιλεγμένων μικροστοιχείων και των συγκεντρώσεων Ξηρού Βάρους σε κάλους προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια βλαστού του ιξού.

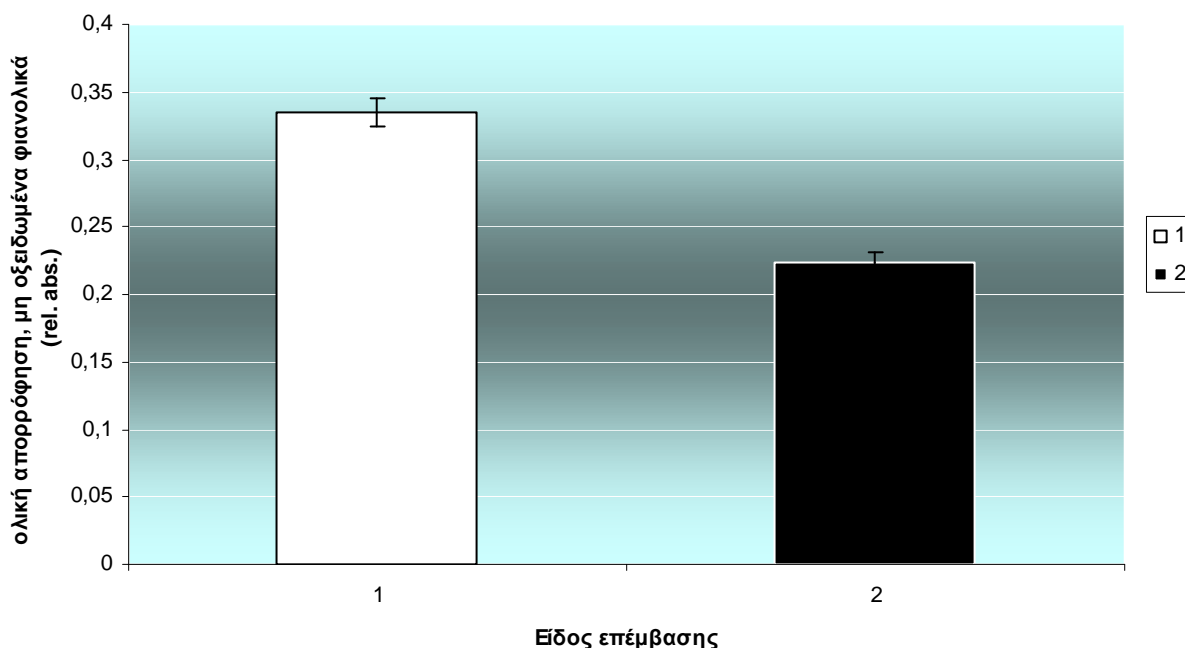
	Fe	Mn	Zn	Cu	B	Ξ.Β.
Διάρκεια Καλλιέργειας	0.486564	0.474003	0.203813	-0.04714	0.328153	0.302016

4.5. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ολικών διαλυτών, μη οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων στους κάλους, οι οποίοι επώαστηκαν σε μέσο που περιείχε ασκορβικό οξύ (Διάγραμμα 42, Πίνακας 38).

Διάγραμμα 42: Επίδραση της προσθήκης ασκορβικού οξέος στη μέτρηση φαινολικών σε κάλους ιξού

Επίδραση της προσθήκης Α.Ο. στη μέτρηση φαινολικών σε κάλους ιξού



(1: υπόστρωμα χωρίς ασκορβικό, 2: υπόστρωμα με ασκορβικό οξύ)

4.6. ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΕΣ

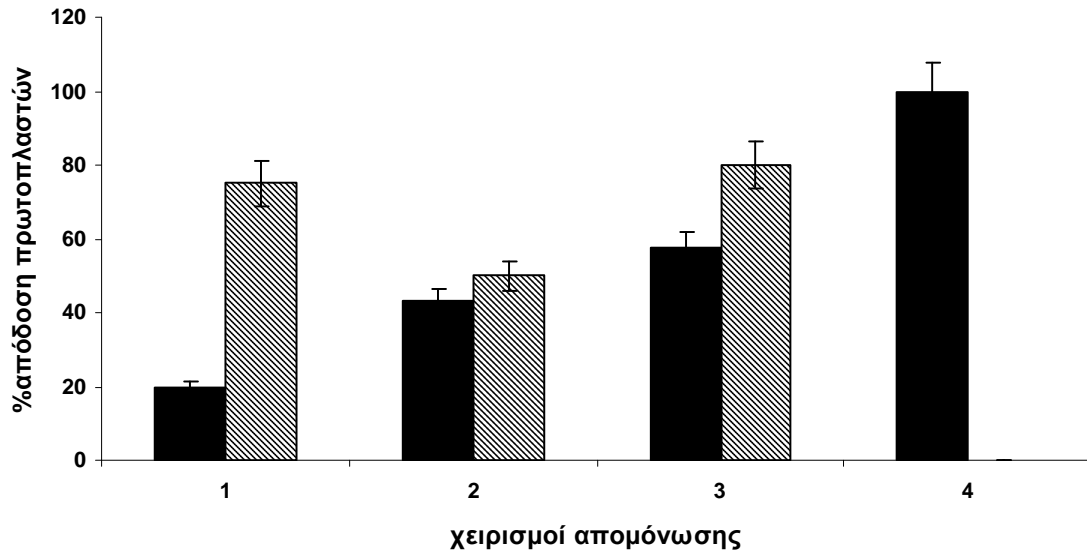
4.6.1. Απομόνωση Πρωτοπλαστών

Περισσότεροι πρωτοπλάστες απομονώθηκαν από τους κάλλους κι όχι από τα φύλλα στην συγκέντρωση 0.008% (w/v) της πεκτινάσης. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην διπλάσια συγκέντρωση πεκτινάσης. Στις υψηλές συγκεντρώσεις και των δύο ενζύμων κανένας πρωτοπλάστης από τους κάλλους δεν απομονώθηκε (Διάγραμμα 42). Ανεξάρτητα από το ένζυμο, οι πρωτοπλάστες που απομονώθηκαν από τα φύλλα ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό βιώσιμοι (περίπου 100%) από αυτούς των κάλων (Διάγραμμα 43). Αυτό πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν κάλοι χρώματος καφέ (ιστοκαλλιέργεια χωρίς ασκορβικό οξύ), το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη οξειδωμένων φαινολικών ουσιών. Παρόμοιο ποσοστό βιωσιμότητας (100%) παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση πρωτοπλαστών που απομονώθηκαν από φύλλα ή κάλους σε πεκτινάση 0.008% και σελλουλάση 0.007%. Σε άριστες συνθήκες, 67×10^4 βιώσιμοι πρωτοπλάστες $g\ fw^{-1}$ ιστού απομονώθηκαν από φύλλα ιξού που διαλύθηκαν σε διάλυμα που περιείχε 0.016% πεκτινάση και 0.007% σελλουλάση (Πίνακας 39).

Η συνολική απομόνωση πρωτοπλαστών ήταν υψηλότερη στους κάλλους απ' ότι στα φύλλα, αλλά οι πρωτοπλάστες οι προερχόμενοι από τους κάλλους ήταν λιγότερο βιώσιμοι, πιθανόν λόγω γήρατος (πιο γερασμένοι)-καφεόχρωμοι κάλοι, που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση στο πείραμα.

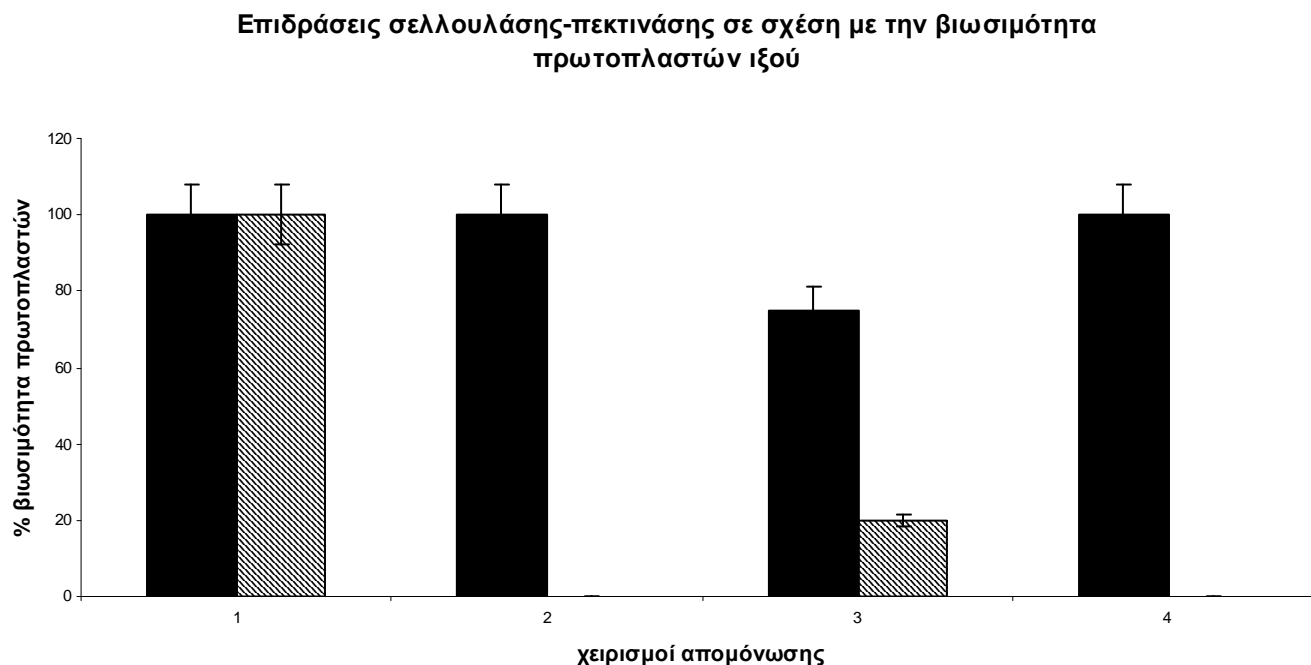
Διάγραμμα 43: Επιδράσεις των χειρισμών απομόνωσης (σελλουλάση και πεκτινάση) σε σχέση με την απόδοση πρωτοπλαστών ιξού. (μαύρες στήλες = ιστός φύλλου, σκιασμένες στήλες = ιστοί κάλων). (***)

Επιδράσεις σελλουλάσης-πεκτινάσης σε σχέση με την απόδοση πρωτοπλαστών ιξού



*****(1)** 0.008% πεκτινάση + 0.007% σελλουλάση **(2)** 0.008% πεκτινάση + 0.014% σελλουλάση **(3)** 0.016% πεκτινάση + 0.007% σελλουλάση **(4)** 0.016% πεκτινάση + 0.014% σελλουλάση

Διάγραμμα 44: Επιδράσεις των χειρισμών απομόνωσης (σελλουλάση και πεκτινάση) σε σχέση με την βιωσιμότητα πρωτοπλαστών ιξού (%). (μαύρες στήλες = ιστός φύλλου, σκιασμένες στήλες = ιστοί κάλων). (***)



*****(1)** 0.008% πεκτινάση + 0.007% σελλουλάση **(2)** 0.008% πεκτινάση + 0.014% σελλουλάση **(3)** 0.016% πεκτινάση + 0.007% σελλουλάση **(4)** 0.016% πεκτινάση + 0.014% σελλουλάση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων, αποδεικνύει ότι υπάρχει διαφορά στατιστικά σημαντική μεταξύ όλων των επεμβάσεων και τιμών (σύγκριση και ανά δύο) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

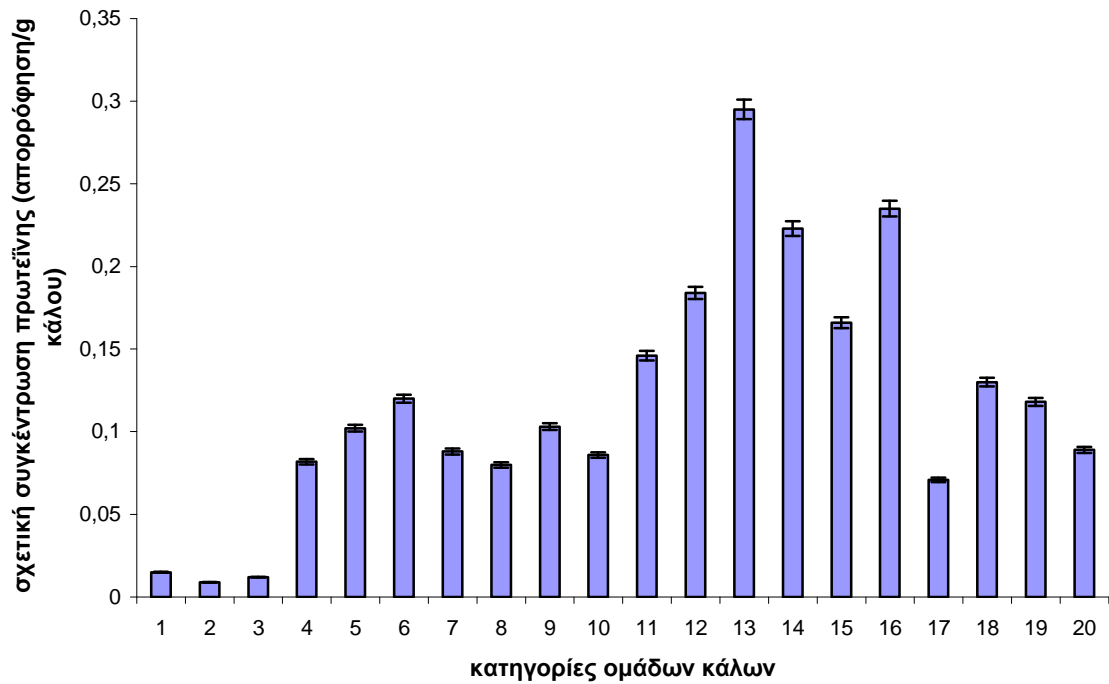
4.7. ΠΑΡΑΓΩΓΗ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.7.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

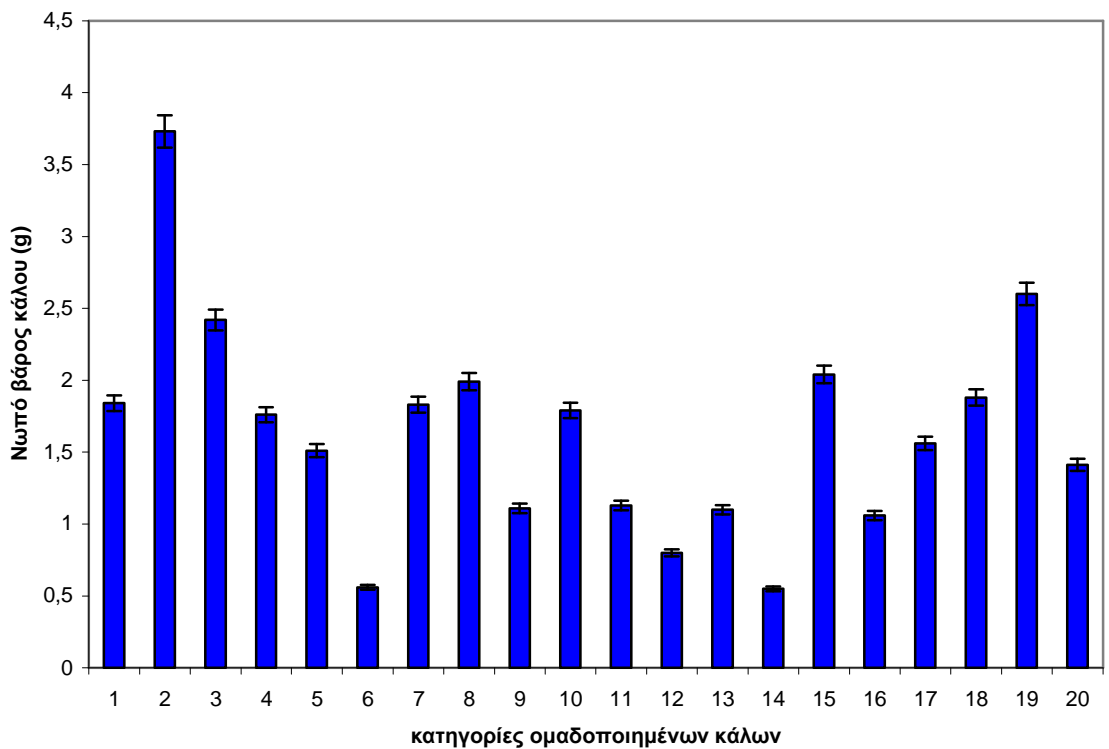
4.7.1.1. Ποσοτικός Προσδιορισμός

Ο μέσος όρος πρωτεΐνης που περιέχεται ανά κάλο είναι 1.178 ± 0.058 $\mu\text{g/g}$ f.w. (νωπό βάρος), ενώ στο αρχικό φυτό δότη είναι 1.318 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$ f.w. (νωπό βάρος).

Διάγραμμα 45: Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης που περιέχεται ανά ομάδα κάλων με βάση την απορρόφηση ανά γραμμάριο κάλου

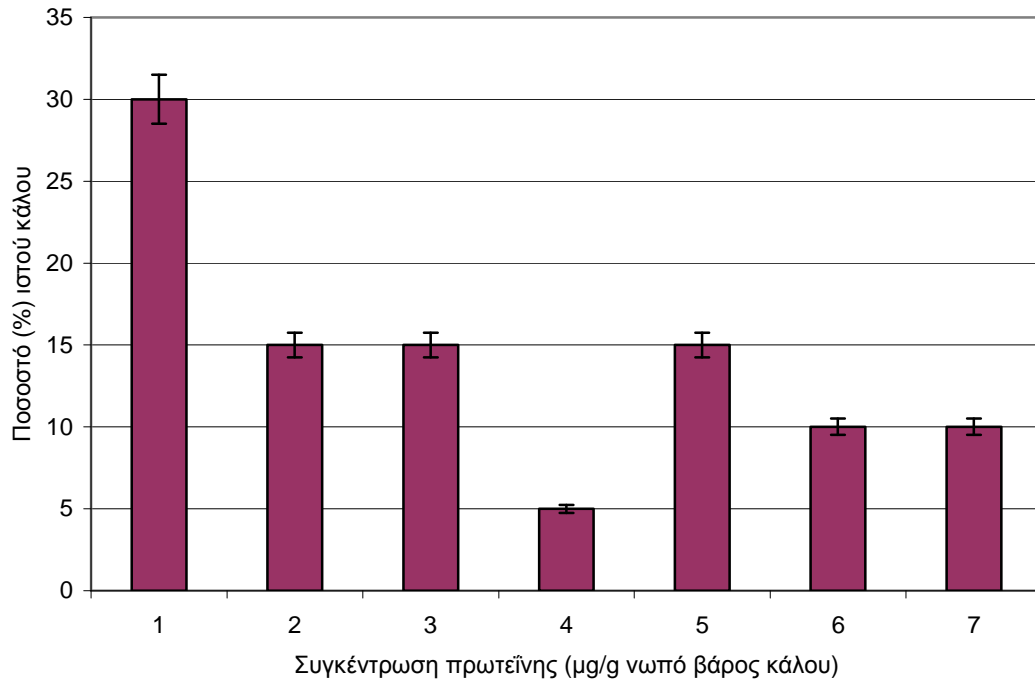


Διάγραμμα 46: Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης που περιέχεται ανά ομάδα κάλων με βάση το Νωπό βάρος κάλου (ανά γραμμάριο)



Διάγραμμα 47: Συχνότητα διακύμανσης συγκέντρωσης πρωτεΐνης (μg/g νωπού βάρους κάλου) σε κάλους ιξού (*Viscum album*) προερχόμενους από έκφυτα βλαστών

Καταγραφή της πρωτεϊνικής διακύμανσης σε κάλους ιξού

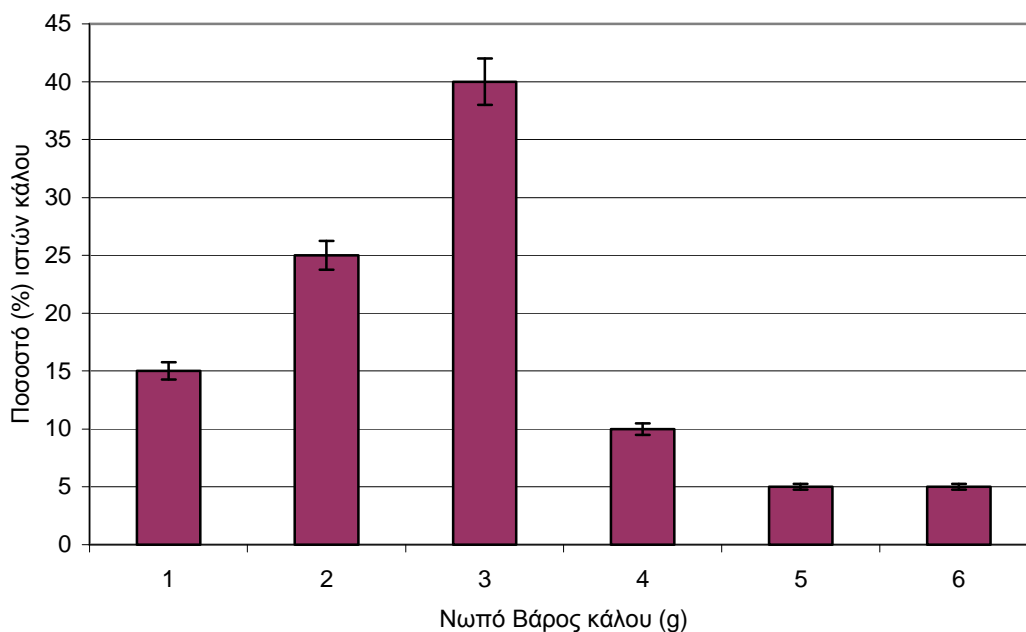


1 = 1.3 - 1.5 μg/g
2 = 1.6 - 2.5 μg/g
3 = 2.6 - 3.5 μg/g

4 = 3.6 - 4.5 μg/g
5 = 4.6 - 5.5 μg/g
6 = 5.5 - 9 μg/g
7 = >9 μg/g

Διάγραμμα 48: Συχνότητα διακύμανσης του Νωπού Βάρους (g) σε κάλους ιξού προερχόμενους από έκφυτα βλαστών (*Viscum album*).

Διακύμανση σε κάλους ιξού του νωπού βάρους



1 = 0.5 -1 g

2 = 1.1 -1.5 g

3 = 1.6 - 2 g

4 = 2.1 - 2.5 g

5 = 2.6 - 3 g

6 = >3 g

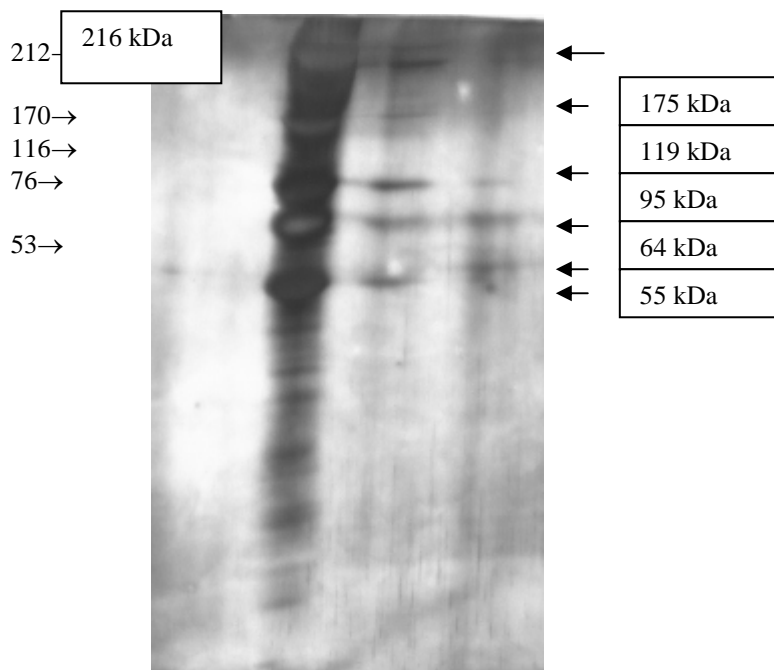
Στο Παράρτημα Πινάκων οι Πίνακες 40, 40A, 40B περιγράφουν αναλυτικά τις τιμές για τα Διαγράμματα 45-48.

4.7.1.2. Ποιοτικός Προσδιορισμός

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έδειξε πέντε βασικές μπάντες σε όλα τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν (500 διαφορετικά δείγματα) οι οποίες ήταν οι εξής: 53, 76, 116 και 170 kDa (Σχήμα 5), πιθανώς αντιπροσωπεύοντας διμερείς και μονομερείς μορφές των λεκτινών (περίπου στα 114 και 57 kDa) (Olsnes, 1982; Vester, 1977). Αυτές οι πρωτεϊνικές μπάντες εντοπίζονται και στο αρχικό φυτό (φυτό δότης), μαζί με μια ακόμη μπάντα πρωτεΐνης στα 212 kDa.

Σχήμα 2. SDS-PAGE πρωτεϊνών ιξού από βλαστούς φυτού δότη και κάλων επαγόμενων από βλαστούς ιξού (τα βέλη δείχνουν τις πρωτεϊνικές μπάντες) (M=πρωτεΐνες-μάρτυρες, S=φυτό ιξού, C=κάλος επαγόμενος από το φυτό)

kDa	M	S	C
-----	---	---	---

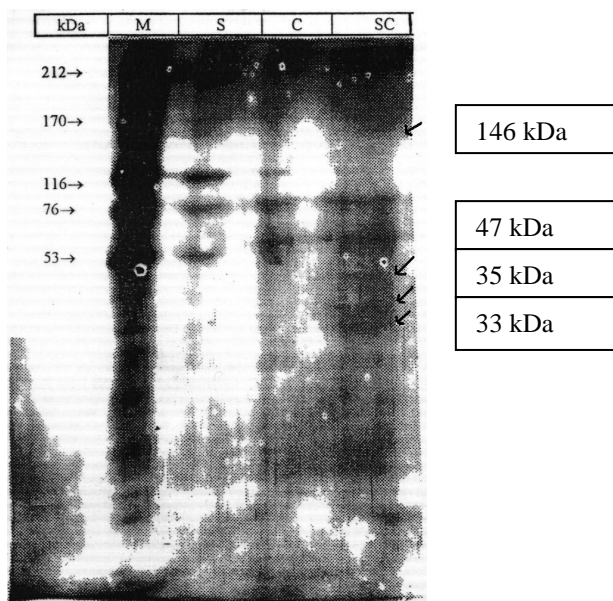


4.7.2. Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία (περιγραφή της ηλεκτροφόρησης πρότυπων πρωτεϊνών), παρατηρήθηκε ότι σε σαράντα σειρές κάλων εμφανίστηκαν πέντε επιπλέον πρωτεϊνικές μπάντες, από αυτές που παρουσίαζε το φυτό-δότης από τις οποίες τρεις ήταν < 53 kDa, μία περίπου στα 100 kDa και μία περίπου στα 150 kDa. Συγκεκριμένα οι κάτω από τα 53 kDa, υπολογίστηκαν στα 47, 35 και 33 kDa, ενώ οι μεγαλύτερες στα 96 και 146 kDa, αντίστοιχα. Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι επίσης στενός κρίκος στην κυτταρική διαφοροποίηση: γι' αυτό είναι πιθανό ότι οι εμβρυογενείς κάλοι του ιξού, που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη και έδειξαν υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης, θα μπορούσαν να παράγουν πρωτεΐνες του ιξού σε υψηλό ρυθμό. Η παρούσα εμφανιζόμενη σωμακλωνική παραλλακτικότητα, από πλευράς ποιοτικής και ποσοτικής παραγωγής πρωτεϊνών του ιξού, είναι σχετικά χαμηλή (8%), αλλά δείχνει για πρώτη φορά την πιθανότητα της *in vitro* παραγωγής σταθερών και καθορισμένων εκχυλισμάτων πρωτεϊνών με κυτοτοξικές και ανοσο-ρυθμιστικές ιδιότητες.

Παρατηρήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών από αυτές του φυτού-δότη και συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι ενώ στο 30% των κάλων η συγκέντρωση της συσσωρευμένης πρωτεΐνης κυμαινόταν στο μ.ο. των 2,6 μg/g φρέσκου βάρους, σ' ένα 10% ξεπερνούσε τα 9 μg/g φρέσκου βάρους.

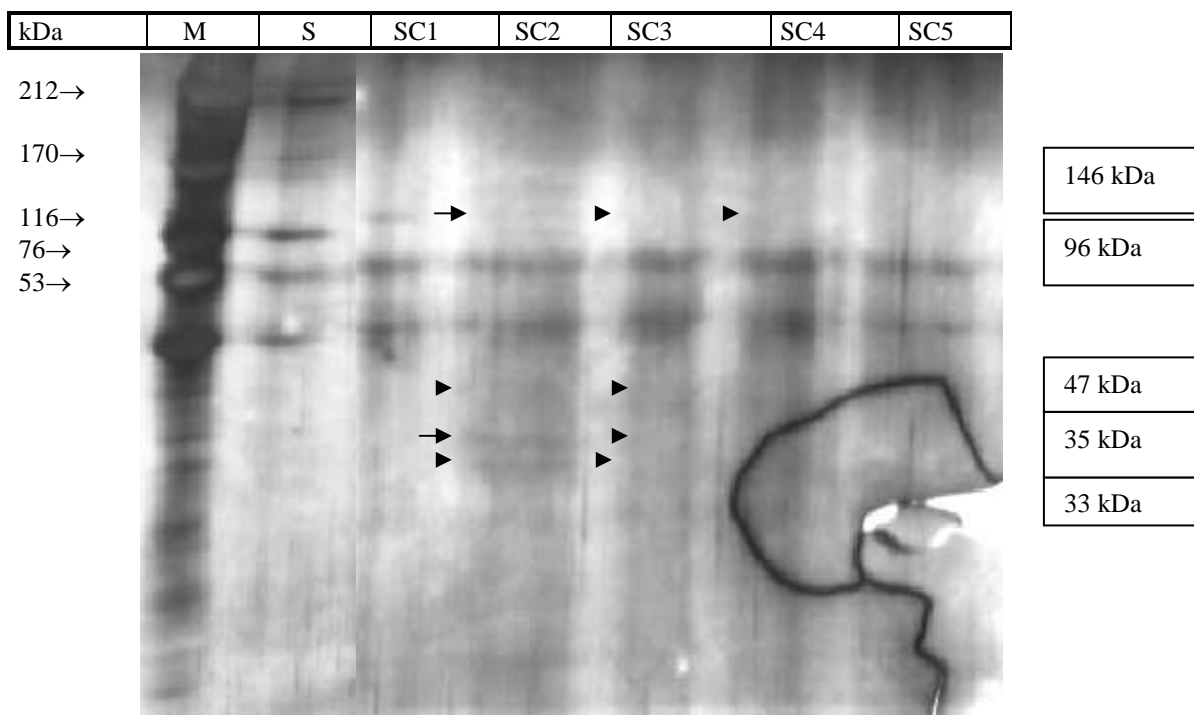
Σχήμα 3. Η εικόνα που παρουσιάζεται στην SDS-PAGE ανάλυση, ανάμεσα σε δείγματα βλαστού-φύλλου (S), επαγόμενου κάλου (C) και σωμακλωνικού κάλου (SC) είναι η παρακάτω:
(όπου M μάρτυρας πρωτεϊνών)



Όσον αφορά την παραλλακτικότητα των επόμενων γενεών των σωμακλωνικών κάλων, η εικόνα που παρουσιάζουν είναι η παρακάτω (σχήμα 4.)

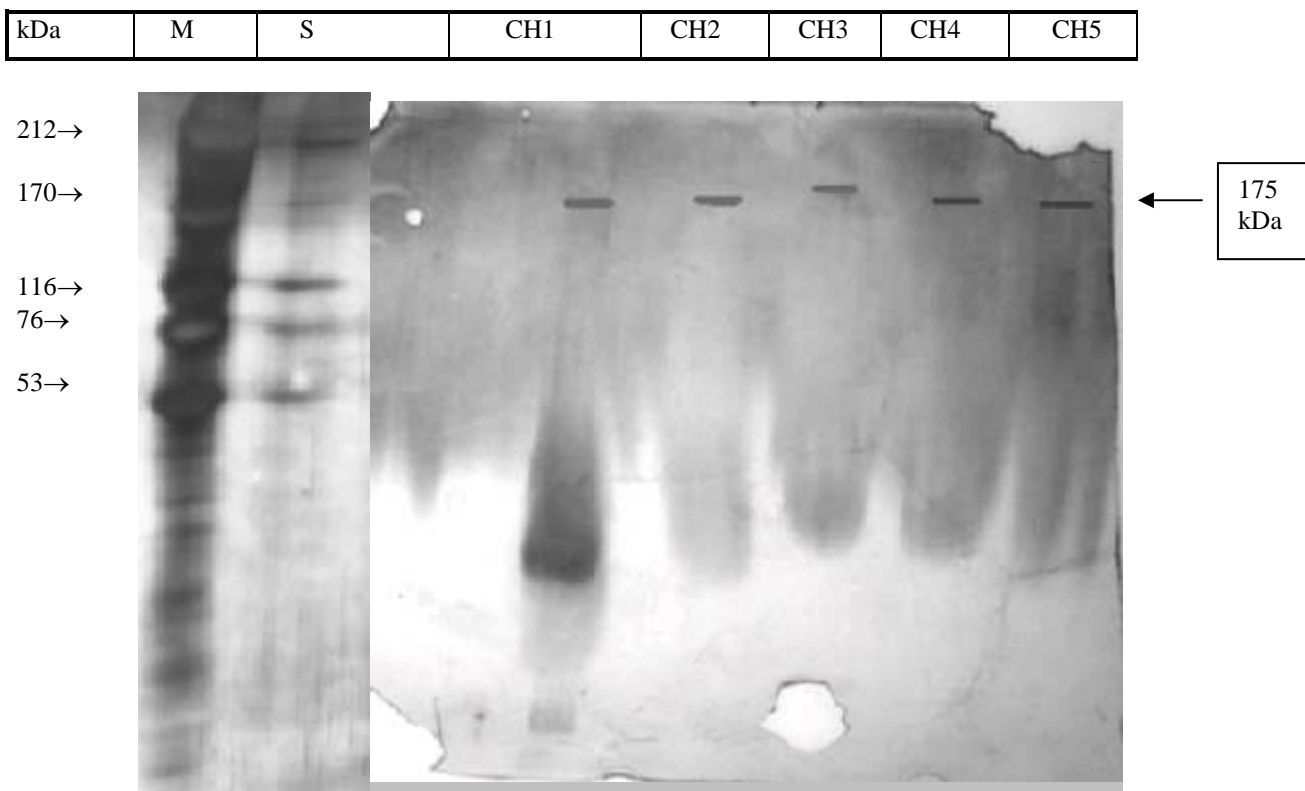
Σχήμα 4. SDS-PAGE πρωτεϊνών ιξού από βλαστούς φυτού δότη και σωμακλωνικών κάλων επαγόμενων από βλαστούς ιξού (τα βέλη δείχνουν τις διαφορετικές πρωτεϊνικές μπάντες)

(M=πρωτεΐνες-μάρτυρες, S=βλαστός ιξού, SCi=κάλος επαγόμενος από βλαστό SC1=κάλος 1ης γενιάς, SC2=κάλος 2^{ης} γενιάς, , SC3=κάλος 3^{ης} γενιάς, , SC4=κάλος 4^{ης} γενιάς, , SC5=κάλος 5^{ης} γενιάς)



Σχήμα 5. SDS-PAGE πρωτεϊνών ιξού από βλαστούς φυτού δότη και κάλων επαγόμενων από βλαστούς ιξού (τα βέλη δείχνουν τις πρωτεϊνικές μπάντες)

(M=πρωτεΐνες-μάρτυρες, S=βλαστός ιξού, CHi=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή επαγόμενος από βλαστό, CH1=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή-έλατο, CH2=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή-βελανιδιά, CH3=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή-καστανιά, CH4=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή-κενάφ, CH5=κάλος σε υπόστρωμα ξενιστή-βαμβάκι



4.7.3. Μακροσκοπική παρατήρηση

Εκτός από τον προαναφερθέντα διαχωρισμό μεταξύ ‘μαύρου’ και ‘λευκού’ κάλου, οι κάλοι του γκι έχουν μια ιδιαίτερη μορφολογική δομή. Έχει συχνά παρατηρηθεί μια υποκίτρινη νηματώδης προεξοχή, που καλύπτει τους κάλλους. Αυτοί, όπως παρατηρήθηκε, δημιουργούνται από μικρές μαύρες δομές με σχήμα σαν σπόρο. Η λειτουργία αυτών των δομών είναι άγνωστη, αλλά είναι πιθανόν να συνδέονται με τα μυζητικά όργανα του φυτού (haustoria). Σωματικά έμβρυα στο σφαιρικό στάδιο παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες κάλων πάνω από 4 εβδομάδες, στο μέσο που περιείχε ασκορβικό οξύ. Η σωματική εμβρυογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού εμβρύου από σωματικούς ιστούς και περιέχει ένα αριθμό ευκρινών σταδίων π.χ. τον σχηματισμό των σφαιρικών εμβρύων (προέμβρυα), την περαιτέρω ανάπτυξη του καρδιάσχημου σταδίου, έως το στάδιο της τορπιλακάτου και τελικά το στάδιο της κοτυληδόνας (Totges 1989). Εφόσον η μορφοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών στα μητρικά φυτά εξαρτάται από ένα καθορισμένο εξειδικευμένο ιστό, είναι πιθανό ότι τα σωματικά έμβρυα του ιξού, τα οποία δείχνουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης του ιστού, θα μπορούσαν να συσσωρεύουν διάφορες ουσίες φαρμακευτικής αξίας σε ικανοποιητικό βαθμό.

Διαφορές που επισημάνθηκαν ανάμεσα σε σωμακλωνικούς και μη κάλλους εντοπίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά (χρώμα, μορφή κάλου) και ποιοτικά (διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών). Η επαγωγή κάλων πραγματοποιήθηκε σε δύο εβδομάδες, ενώ παρατηρήθηκαν σωματικά

έμβρυα στο σφαιρικό στάδιο (Kintzios and Barberaki, 2000). Οι κάλοι στους οποίους παρατηρήθηκαν τα σωματικά έμβρυα είχαν καλλιεργηθεί για πάνω από τέσσερις εβδομάδες σε θρεπτικό υπόστρωμα και παρουσίαζαν λευκό-ροζ χρώμα.

Κατά την ιστοκαλλιέργεια του *V. album*, παρουσιάστηκαν έκφυτα τα οποία παρουσίασαν χρώμα καφέ. Γενικά, στην ιστοκαλλιέργεια έκφυτα που καφετίζουν μπορεί να είναι ένα σημαντικό πρόβλημα, γιατί συνήθως αναπτύσσουν νεκρωτικές κηλίδες οι οποίες σποραδικά μπορεί να οδηγήσουν τα έκφυτα σε γήρανση ή και θάνατο, το οποίο επηρεάζει αρνητικά την επαγωγή κάλου. Παρ' όλα αυτά, αυτοί οι κάλοι ιξού, ανάλογα με το πρωτόκολλο απολύμανσης και την σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος, σχηματίστηκαν σε ποσοστό 4-12% των καλλιεργούμενων εκφύτων πολλαπλασιάστηκαν περαιτέρω. Αυτοί οι κάλοι παρέμειναν χρώματος μαύρου-καφέ ακόμη και μετά από επαναλαμβανόμενες υπό-καλλιέργειες.

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος (σε συγκέντρωση 10 mg/l) στο υπόστρωμα, μείωσε σημαντικά την συχνότητα των νεκρωτικών συμπτωμάτων, επιτρέποντας έτσι την αύξηση επαγωγής κάλων (στο 13-45% των καλλιεργούμενων εκφύτων, ποσοστό που εξαρτάται από το υπόστρωμα και το είδος του εκφύτου). Αυτοί οι κάλοι παρουσιάζουν ένα ροζ-λευκό χρώμα και επιδεικνύουν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού (εκφραζόμενο σε νωπό και ξηρό βάρος) από ότι οι μαύροι κάλοι. Η εικόνα αυτή των λευκό-ροζ κάλων έχει παρατηρηθεί κι από τον Fukui *et al.* (1990).

Εικόνα 9.: Κάλος (μαύρος) προερχόμενος από έκφυτο βλαστού ιξού καλλιεργούμενος σε θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μM NAA, χωρίς την προσθήκη Ασκορβικού οξέος



Εικόνα 10. : Κάλος προερχόμενος από έκφυτο βλαστού ιξού καλλιεργούμενος σε θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μM NAA, όπου διακρίνονται μικρές μαύρες δομές με σχήμα σαν σπόρο



Εικόνα 11. : Λευκό-ροζ κάλος επαγόμενος από βλαστό ιξού σε MS + 4.95 μM NAA με την προσθήκη 10 mg/l ασκορβικού οξέος και καρποφορία σφαιρικών σωματικών εμβρύων



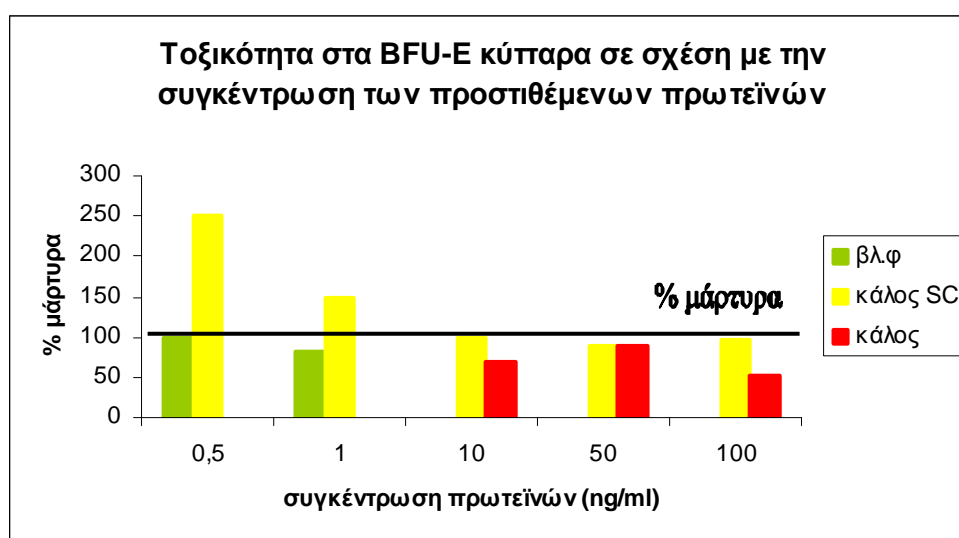
4.8. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

4.8.1. Βιοδοκιμές τοξικότητας

4.8.1.1. Βιοδοκιμές τοξικότητας σε φυσιολογικές σειρές

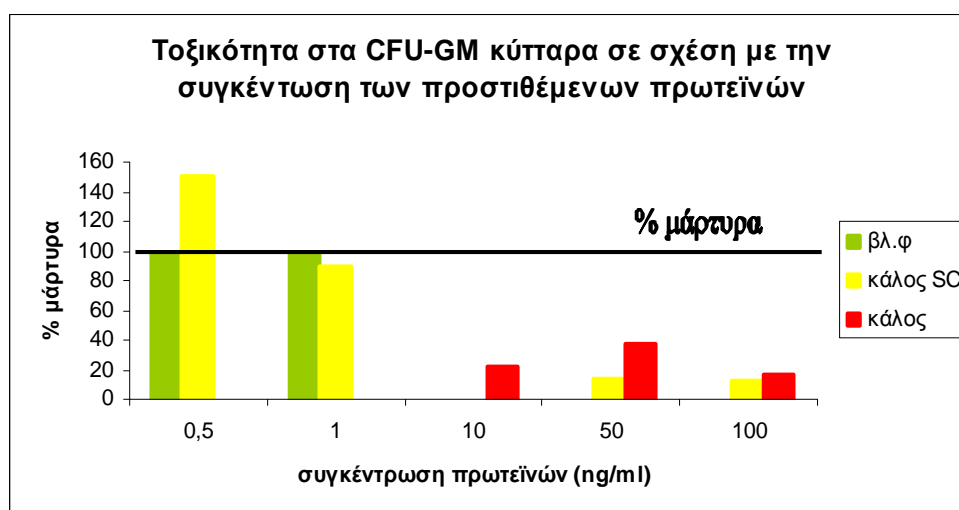
Τόσο οι παραγόμενες από κάλους πρωτεΐνες, όσο και το εκχύλισμα από το φυτό δότη, προστέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις, και στους πίνακες, που ακολουθούν, η σύγκριση γίνεται με βάση την ανάπτυξη που παρατηρείται στο υπόστρωμα μάρτυρα (υπόστρωμα χωρίς πρωτεΐνη).

Διάγραμμα 49: Μελέτη της τοξικότητας στα BFU-E φυσιολογικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα –SC-)



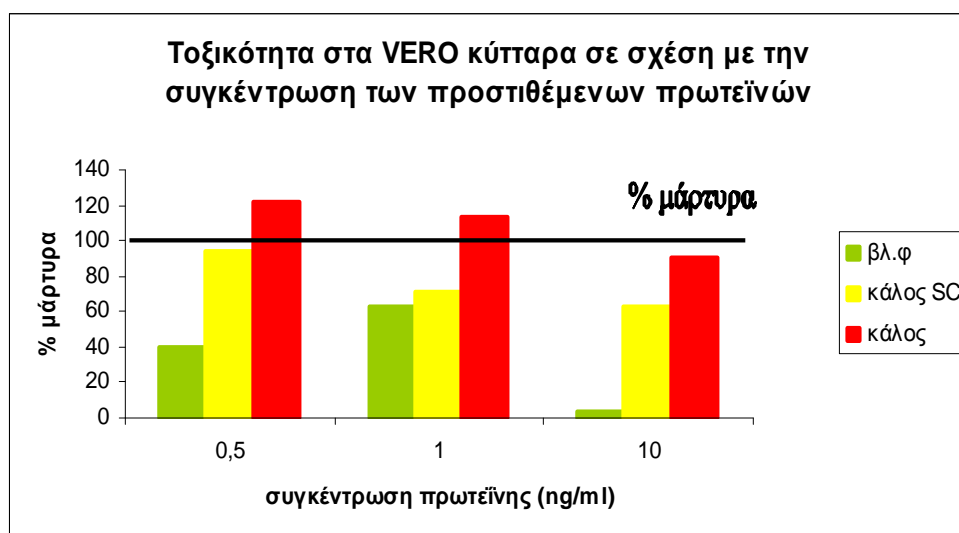
Στο παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται καθαρά ότι το εκχύλισμα από το φυτό δότη εμφανίζει τοξικότητα από τις μικρές ακόμη συγκεντρώσεις της κυτταρικής σειράς BFU-E, ενώ ο απλός κάλος εμφανίζει τοξικότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο κάλος με την σωμακλωνική παραλλακτικότητα (SC) στις μικρές συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να παρουσιάζει τοξικότητα, αλλά στις μεγαλύτερες τείνει να γίνει τοξικός.

Διάγραμμα 50: Μελέτη της τοξικότητας στα CFU-GM φυσιολογικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα –SC-)



Η κυτταρική σειρά CFU-GM παρουσιάζεται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην επίδραση των πρωτεϊνών από τον ιξό είτε αυτές προέρχονται από το φυτό, είτε από τους κάλους, ιδιαίτερα στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Για τις μικρές συγκεντρώσεις (0,5 και 1 ng/ml) πρωτεϊνών που προέρχονται από το φυτό και τον κάλο δεν παρουσιάζεται τοξικότητα.

Διάγραμμα 51: Μελέτη της τοξικότητας στα VERO φυσιολογικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα –SC-)



Στη φυσιολογική σειρά VERO, η τοξικότητα στα κύτταρα εμφανίζεται ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, κυρίως για την πρωτεΐνη που προέρχεται από το φυτό και τον σωμακλωνικό κάλο, ενώ για αυτήν που προέρχεται από τον κάλο είναι εμφανής για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 ng/ml.

Γενικά πάντως φαίνεται ότι το σημείο 10 ng/ml είναι οριακό – σημείο ορόσημο- στην επίδραση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ως προς την τοξικότητα σε όλες κυτταρικές σειρές και για όλες τις επεμβάσεις (από όπου κι αν προέρχεται η πρωτεΐνη). Κάποιες σειρές εμφανίζονται ιδιαίτερα ευαίσθητες στις επεμβάσεις (CFU-GM και VERO), ενώ η BFU-E για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (άνω των 10 ng/ml). Το εκχύλισμα από το φυτό εμφανίζεται πολύ τοξικό για όλες τις κυτταρικές σειρές ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. VERO), οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον απλό κάλο εμφανίζουν τοξικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω των 10 ng/ml, ενώ οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα εμφανίζουν τοξικότητα ανάλογα με το είδος των κυτταρικών σειρών: στην κυτταρική σειρά VERO εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις (κάτω των 10 ng/ml), στην κυτταρική σειρά CFU-GM σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (πάνω από 10 ng/ml), ενώ στην κυτταρική σειρά BFU-E δεν φαίνεται να προκαλούν τοξικότητα.

Στους πίνακες 41 και 42, που ακολουθούν, χαρακτηρίζεται συνοπτικά η τοξικότητα που παρατηρείται ανάλογα με την συγκέντρωση της προστιθέμενης πρωτεΐνης και με την προέλευση αυτής (πρωτεΐνη από φυτό δότη ή παραγόμενη πρωτεΐνη από κάλο ή κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πίνακας 41: Τοξικότητα της σειράς BFU-E φυσιολογικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)				
	0,5	1	10	50	100
Φυτό δότη	Τοξικό	Τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ Τοξικό	Πολύ Τοξικό
Κάλο	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό
Κάλο με SC	Μη τοξικό	Μη τοξικό	Μη τοξικό	Μη τοξικό	Μη τοξικό

Πίνακας 42: Τοξικότητα της σειράς CFU-GM φυσιολογικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)				
	0,5	1	10	50	100
Φυτό δότη	Τοξικό	Τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ Τοξικό	Πολύ Τοξικό
Κάλο	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό
Κάλο με SC	Μη Τοξικό	Μη Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό

Πίνακας 43: Τοξικότητα της σειράς VERO (φυσιολογικών κυττάρων), σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)				
	0,5	1	10	50	100
Φυτό δότη	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό
Κάλο	Μη Τοξικό	Μη Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό	τοξικό
Κάλο με SC	Τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ τοξικό	Πολύ Τοξικό

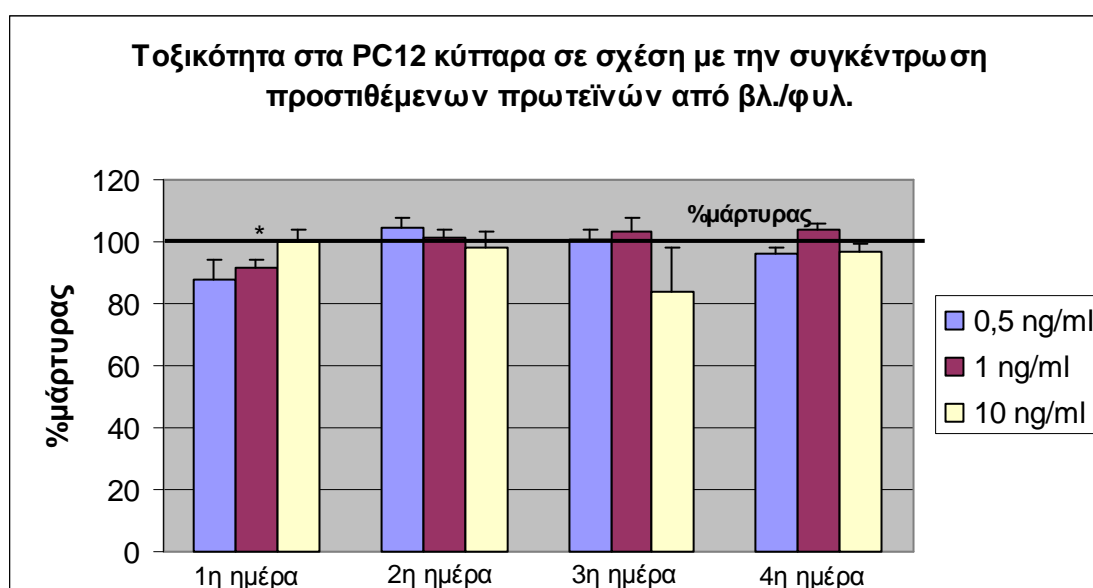
Στα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα από το φυτό δότη είναι πολύ τοξικό έως τοξικό σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, ακόμη και στις πολύ μικρές. Οι παραγόμενες, in vitro, πρωτεΐνες που προέρχονται από κάλο παρουσιάζουν τοξικότητα και στις δύο σειρές των κυττάρων, ενώ στις χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι δεν είναι τοξικές και ιδιαίτερα αυτές οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η επιπλέον ουσία που περιέχεται στον κάλο με την σωμακλωνική παραλλακτικότητα, πολύ πιθανόν ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών που προάγουν την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος κι ευνοούν την

ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων, στα οποία εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, ενώ παράλληλα ασκούν και τοξική επίδραση στα μελετηθέντα καρκινικά κύτταρα.

4.8.1.2. Βιοδοκιμές τοξικότητας σε καρκινικές σειρές

Τόσο οι παραγόμενες πρωτεΐνες, όσο και το εκχύλισμα από το φυτό δότη, προστέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις, και στους πίνακες, που ακολουθούν, η σύγκριση γίνεται με βάση την ανάπτυξη που παρατηρείται στο υπόστρωμα μάρτυρα (υπόστρωμα χωρίς πρωτεΐνη) και τον χρόνο επώασης.

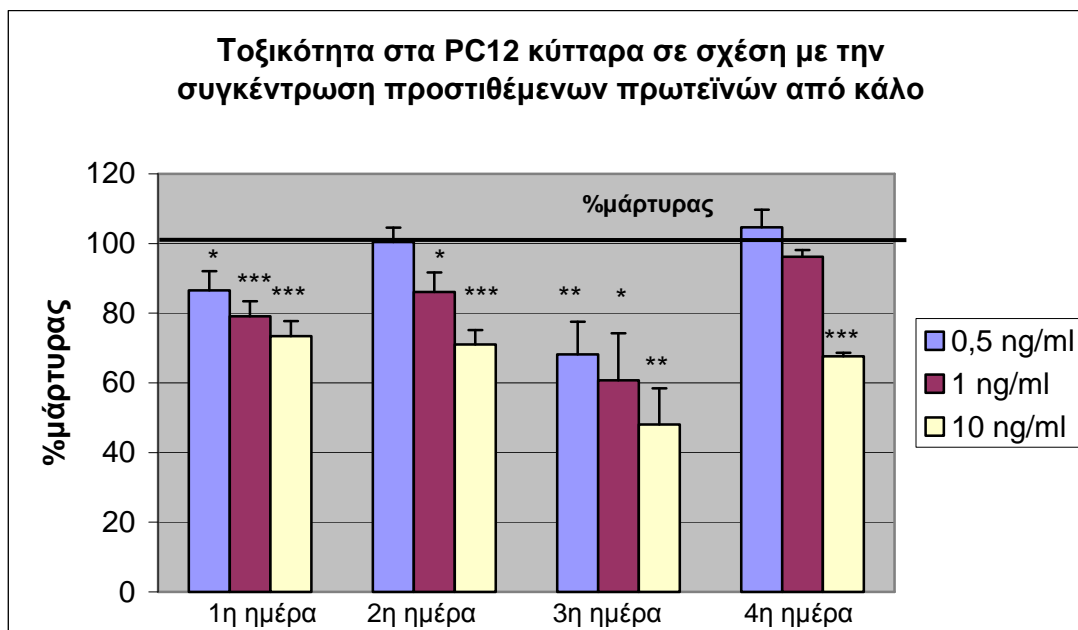
Διάγραμμα 52: Μελέτη της χρονικά μεταβαλλόμενης τοξικότητας στα PC12 καρκινικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού



τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα PC12 στις μικρές συγκεντρώσεις από την πρώτη κιόλας ημέρα, αυτό δεν συνεχίζεται για τις επόμενες ημέρες επώασης, όπου φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη κυττάρων, κάτι που δεν συμβαίνει με την προσθήκη της μεγαλύτερης δόσης (10 ng/ml), η οποία φαίνεται ότι όσο περνούν οι μέρες επώασης τόσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που έχουν επιβιώσει (αύξηση της τοξικότητας).

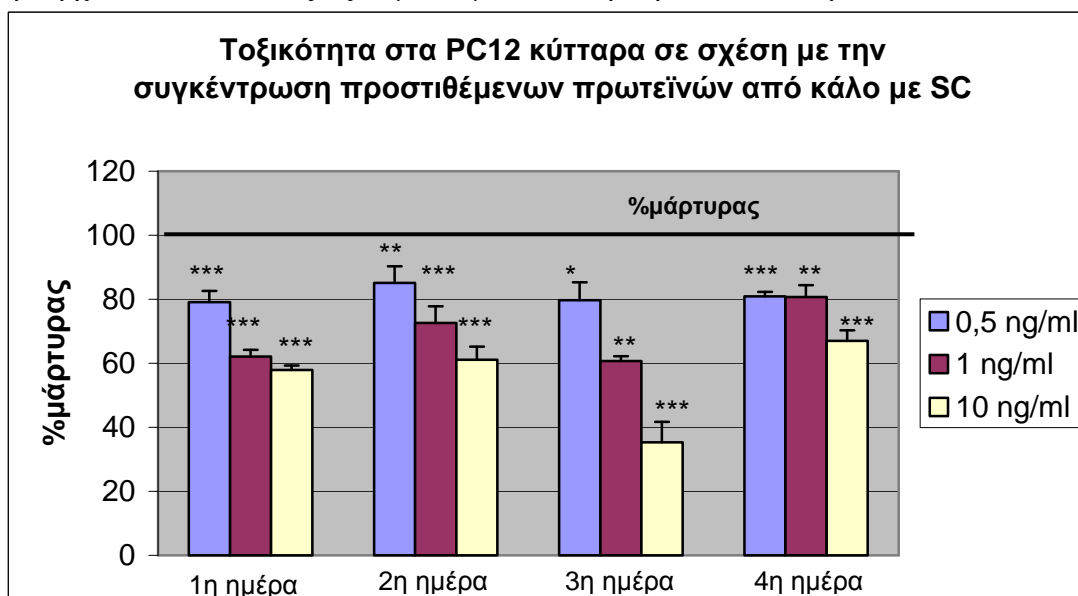
Γενικά, οι διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων με 0,5 ng/ml και 1 ng/ml πρωτεΐνης δεν είναι στατιστικά σημαντικές παρά μόνο για την πρώτη ημέρα επώασης (για $p < 5\%$), ενώ είναι όσον αφορά την προσθήκη 10 ng/ml για την τρίτη ημέρα επώασης.

Διάγραμμα 53: Μελέτη της χρονικά μεταβαλλόμενης τοξικότητας στα PC12 καρκινικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από κάλους ιξού



Η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα στην προσθήκη πρωτεϊνών από κάλους είναι πολύ μεγαλύτερη έναντι αυτών από το φυτό ιζού και φαίνεται από την πρώτη κιόλας ημέρα επώασης. Και στις τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης πρωτεϊνών, η τοξικότητα αυξάνει όσο αυξάνει ο χρόνος επώασης, εκτός από την δεύτερη μέρα της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Αυτό που παρατηρείται και για τρεις συγκεντρώσεις είναι ότι κατά την τέταρτη ημέρα επώασης παρατηρείται αύξηση των κυττάρων και μείωση της τοξικότητας (κάτι που παρατηρείται και για τα φυσιολογικά κύτταρα σε κάποιες συγκεντρώσεις- κάλος στην κυτταρική σειρά VERO σε συγκεντρώσεις 0,5 ng/ml και 1 ng/ml, κάλος με SC στις κυτταρικές σειρές BFU-E, CFU-GM για τις 0,5 ng/ml και 1 ng/ml συγκεντρώσεις).

Διάγραμμα 54: Μελέτη της χρονικά μεταβαλλόμενης τοξικότητας στα PC12 καρκινικά κύτταρα μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών που προέρχονται από κάλους ιζού με σωμακλωνική παραλλακτικότητα (SC)



Η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα της σειράς PC12 είναι έντονη από την πρώτη κιόλας ημέρα επώασης και πιο έντονη την τρίτη ημέρα -στατιστικώς σημαντικές διαφορές- και για τις τρεις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Την τέταρτη ημέρα παρατηρείται ό,τι και στην επώαση με πρωτεΐνες από κάλο (ανάπτυξη κυττάρων).

Η τοξικότητα παρουσιάζεται μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση της προστιθέμενης πρωτεΐνης (αναλογική σχέση) και όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επώασης (συγκεντρώσεις 1 ng/ml και 10 ng/ml) έως τις τρεις πρώτες ημέρες .

Γενικά φαίνεται ότι για την επίτευξη μεγαλύτερης τοξικότητας ο χρόνος επώασης είναι σχετικός, αλλά δεν είναι απεριόριστος. Φαίνεται ότι από την τέταρτη ημέρα κι έπειτα ο χρόνος βοηθά την ανάπτυξη των κυττάρων κι όχι την καταστροφή τους. Ίσως μετά την πάροδο αυτού του χρόνου η δράση των κυτταροτοξικών πρωτεϊνών (βισκοτοξινών, λεκτινών) που περιέχονται στις προστιθέμενες ουσίες ατονούν και επικρατεί η δράση των ανοσορυθμιστικών πρωτεϊνών με θετικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη των κυττάρων (λεκτίνες), μόνο σε επίπεδο οργανισμού, και σίγουρα, χρειάζεται επανάληψη της δόσης (και κατ' επέκταση επανάληψη της θεραπείας).

Γενικά, συγκρίνοντας τις μέρες η πρώτη με την τρίτη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μόνο για την συγκέντρωση 10 ng/l, ενώ η πρώτη με την τέταρτη δεν διαφέρουν που σημαίνει ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται φτάνοντας τα αρχικά επίπεδα της καλλιέργειας.

Στο εκχύλισμα πρωτεϊνών από κάλο αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί αφού το εκχύλισμα είναι γενικά πιο καθαρό από άλλες ουσίες και περιέχει πρωτεΐνες του ιξού με συγκεκριμένη δράση. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο για τον κάλο με SC τόσο στις κυτταρικές σειρές με φυσιολογικά κύτταρα, όσο και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η δράση του εκχυλίσματος αυτού μπορεί να αιτιολογηθεί με βάση την διαφορετική πρωτεΐνη που περιέχει, λόγω σωμακλωνικής παραλλακτικότητας, η οποία φαίνεται από τα πειράματα να προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 44: Αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων τοξικότητας της σειράς PC12 καρκινικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα), κατά την πρώτη και δεύτερη μέρα

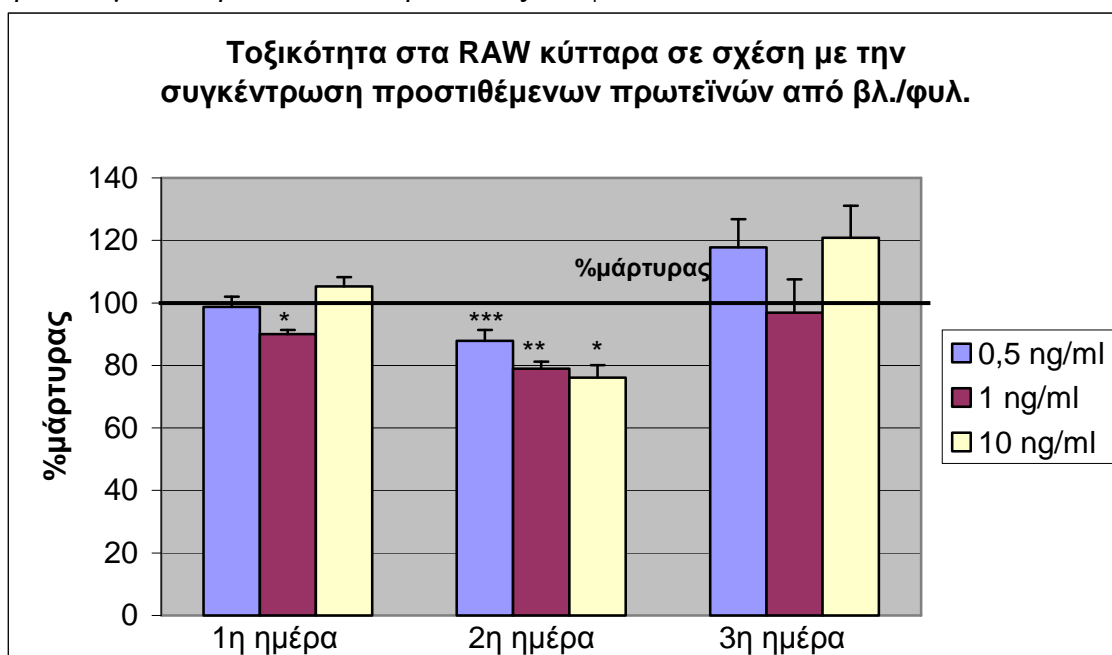
ρ	Πρώτη ημέρα	μέσος	se	ρ	Δεύτερη ημέρα	μέσος	se
	βλ. /φυλ. 0,5 ng/ml	88,02878	5,908238		βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	104,3911	3,374459
*	βλ. /φυλ. 1 ng/ml	91,33112	2,989175		βλ./φυλ. 1 ng/ml	101,1293	2,799046
	βλ./φυλ. 10 ng/ml	99,93479	4,198119		βλ./φυλ. 10 ng/ml	97,9229	5,139777
*	κάλος 0,5 ng/ml	86,59778	5,450071		κάλος 0,5 ng/ml	100,3987	4,151838
***	κάλος 1 ng/ml	79,13402	4,290884	*	κάλος 1 ng/ml	86,06603	5,65622
***	κάλος 10 ng/ml	73,38527	4,363328	***	κάλος 10 ng/ml	70,99001	4,12961
***	κάλος SC 0,5 ng/ml	83,55534	2,561254	**	κάλος SC 0,5 ng/ml	93,83686	4,211606
***	κάλος SC 1 ng/ml	70,07211	2,064755	***	κάλος SC 1 ng/ml	83,28668	4,495553
**	κάλος SC 10 ng/ml	71,45738	2,465184	***	κάλος SC 10 ng/ml	77,11718	3,10288

Πίνακας 45: Αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων τοξικότητας της σειράς PC12 καρκινικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα), κατά την Τρίτη και τέταρτη μέρα

ρ	Τρίτη μέρα	mean	se	ρ	Τέταρτη μέρα	mean	se
	βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	100,3295	3,547031		βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	95,91254	1,990734
	βλ./φυλ. 1 ng/ml	103,2858	4,134326		βλ./φυλ. 1 ng/ml	104,1123	1,464757
	βλ./φυλ. 10 ng/ml	83,85525	14,50557		βλ./φυλ. 10 ng/ml	97,08904	1,974754
**	κάλος 0,5 ng/ml	68,21082	9,310904		κάλος 0,5 ng/ml	104,6714	5,063027
*	κάλος 1 ng/ml	60,7725	13,49078		κάλος 1 ng/ml	96,22313	1,925705
**	κάλος 10 ng/ml	48,08179	10,31765	***	κάλος 10 ng/ml	67,63699	0,988613
*	κάλος SC 0,5 ng/ml	80,06602	5,331009	***	κάλος SC 0,5 ng/ml	83,67499	2,663508
**	κάλος SC 1 ng/ml	66,40247	2,430178	**	κάλος SC 1 ng/ml	83,86135	2,826425
***	κάλος SC 10 ng/ml	52,12358	10,97938	***	κάλος SC 10 ng/ml	78,56735	3,734295

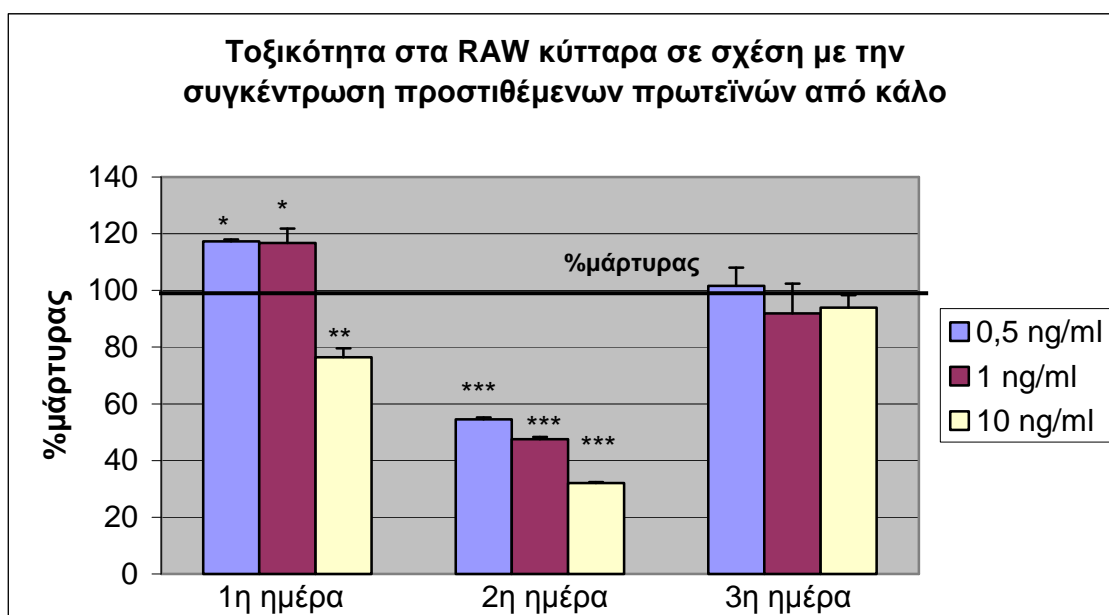
Οι επεμβάσεις που έγιναν στην καρκινική σειρά RAW, έδειξαν ότι για την δεύτερη μέρα επώασης οι όλες οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών του φυτού ιξού που προστέθηκαν ήταν τοξικές, ενώ από την τρίτη ημέρα κι έπειτα φαίνεται ότι ενισχύεται η ανάπτυξη των κυττάρων (θεωρήθηκε ότι λόγω αυτού του φαινομένου δεν υπήρχε λόγος μέτρησης της τέταρτης ημέρας, γι' αυτό και δεν έγιναν μετρήσεις την ημέρα αυτή).

Διάγραμμα 55: Τοξικότητα στα κύτταρα RAW σε σχέση με την συγκέντρωση προστιθέμενων πρωτεϊνών από βλαστούς και φύλλα



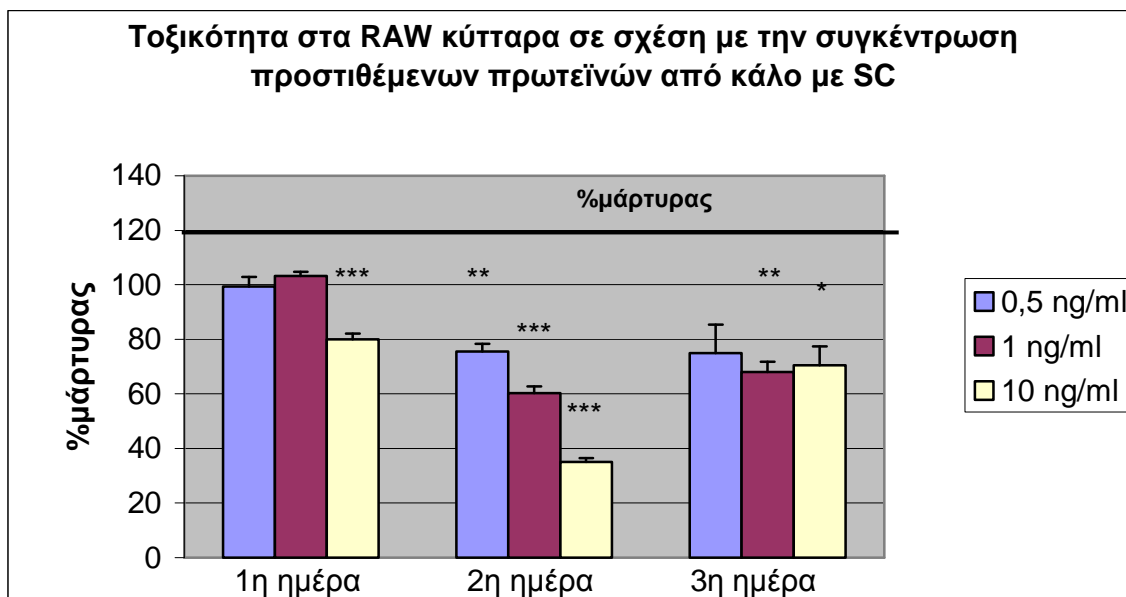
Για την συγκεκριμένη καρκινική σειρά (RAW) η μεγαλύτερη τοξικότητα παρουσιάζεται και πάλι την δεύτερη ημέρα επώασης για όλες τις συγκεντρώσεις των προστιθέμενων πρωτεϊνών από κάλο, ενώ την τρίτη ημέρα ευνοείται η ανάπτυξη των κυττάρων (ακριβώς γι' αυτό το λόγο δεν υπάρχει μέτρηση κατά την τέταρτη ημέρα, όπως διευκρινίστηκε και παραπάνω).

Διάγραμμα 56: Τοξικότητα στα RAW κύτταρα σε σχέση με την συγκέντρωση προστιθέμενων πρωτεϊνών από κάλο



Η τοξικότητα για την καρκινική σειρά RAW είναι μεγαλύτερη κατά την δεύτερη ημέρα επώασης και για όλες τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και περισσότερο για την μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 ng/ml) από κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα, ενώ κατά την τέταρτη ημέρα παρατηρείται ανάπτυξη των κυττάρων, στατιστικώς σημαντική μόνο για την μεγαλύτερη συγκέντρωση προστιθέμενων πρωτεϊνών.

Διάγραμμα 57: Τοξικότητα στα RAW κύτταρα σε σχέση με την συγκέντρωση προστιθέμενων πρωτεϊνών από κάλο με SC



Πίνακας 46: Τοξικότητα της σειράς PC12 καρκινικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)		
	0,5	1	10
Φυτό δότη	Μη Τοξικό	Μη τοξικό	Τοξικό
Κάλο	Μη τοξικό	Τοξικό	Πολύ τοξικό
Κάλο με SC	Τοξικό	Τοξικό	Πολύ Τοξικό

Πίνακας 47: Τοξικότητα της σειράς RAW καρκινικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

Πρωτεΐνη από:	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (ng/ml)		
	0,5	1	10
Φυτό δότη	Μη τοξικό	Τοξικό	Μη τοξικό
Κάλο	Τοξικό	Τοξικό	Τοξικό
Κάλο με SC	τοξικό	Τοξικό	Πολύ Τοξικό

Τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

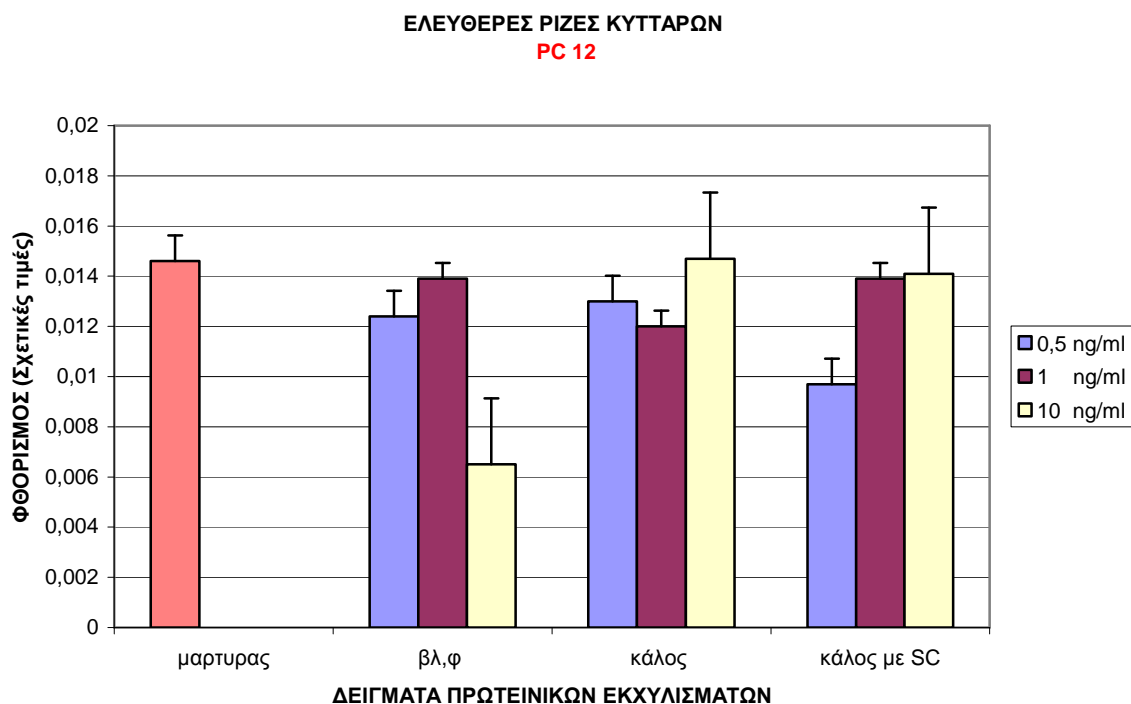
Πίνακας 48: Αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων τοξικότητας της σειράς RAW καρκινικών κυττάρων, σε διάφορες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που προέρχονται από φυτό ιξού και κάλους ιξού (απλό και με σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

ρ	Πρώτη ημέρα	mean	se	ρ	Δεύτερη ημέρα	mean	se
	βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	98,74661	3,307186	***	βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	87,91148	3,451502
*	βλ./φυλ. 1 ng/ml	90,02371	1,314717	**	βλ./φυλ. 1 ng/ml	79,00415	2,253434
	βλ./φυλ. 10 ng/ml	105,3191	2,941606	*	βλ./φυλ. 10 ng/ml	76,10514	4,019738
**	κάλος 0,5 ng/ml	117,2934	0,661437	***	κάλος 0,5 ng/ml	54,55048	0,673058
*	κάλος 1 ng/ml	116,7005	5,111557	***	κάλος 1 ng/ml	47,57953	0,731881
**	κάλος 10 ng/ml	76,41844	3,148099	***	κάλος 10 ng/ml	32,01912	0,41816
	κάλος SC 0,5 ng/ml	99,25474	3,551866	**	κάλος SC 0,5 ng/ml	75,51867	2,831323
	κάλος SC 1 ng/ml	103,2351	1,49829	***	κάλος SC 1 ng/ml	60,24896	2,446843
***	κάλος SC 10 ng/ml	79,96454	2,084748	***	κάλος SC 10 ng/ml	35,06571	1,434936
ρ	Τρίτη ημέρα	mean	se				
	βλ./φυλ. 0,5 ng/ml	117,7596	8,990843				
	βλ./φυλ. 1 ng/ml	96,83841	10,72585				
	βλ./φυλ. 10 ng/ml	120,8624	10,26745				
	κάλος 0,5 ng/ml	101,5613	6,523952				
	κάλος 1 ng/ml	91,92037	10,43031				
	κάλος 10 ng/ml	93,9759	4,379224				
	κάλος SC 0,5 ng/ml	74,94145	10,40135				
**	κάλος SC 1 ng/ml	67,99375	3,753369				
*	κάλος SC 10 ng/ml	70,51363	6,839438				

4.8.2. Βιοδοκιμές ελευθέρων ριζών

Στην προσπάθεια να ερευνηθεί και να μετρηθεί η παραγωγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα των καλλιεργούμενων κυτταρικών σειρών, ως συνέπεια της δράσης των προστιθέμενων πρωτεϊνών από το φυτό του ιξού (in vivo) και από τους κάλους προερχόμενους από αυτό (in vitro), διαπιστώθηκε ότι για την καρκινική σειρά PC12, στις χαμηλές συγκεντρώσεις όλων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων η παραγωγή ελευθέρων ριζών (E.P.) ήταν μικρότερη από αυτή του μάρτυρα, ενώ η χαμηλότερη τιμή (χαμηλότερη συσσώρευση E.P.) σημειώθηκε για την μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 ng/ml) πρωτεΐνης από το φυτό του ιξού.

Διάγραμμα 58: Μέτρηση ελεύθερων ριζών κυττάρων σε κύτταρα της καρκινικής σειράς PC 12 (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού)



Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης (Πίνακας 49), όπου εξάγεται το συμπέρασμα ότι η επίδραση των διαφόρων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στη σειρά PC 12 δεν είναι στατιστικά σημαντική.

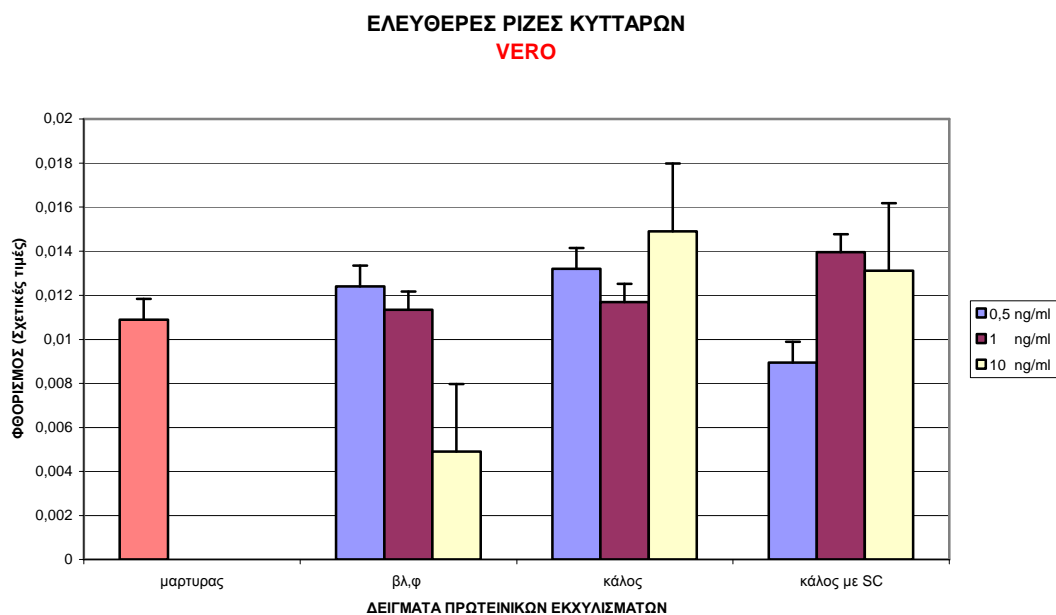
Πίνακας 49: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης επαγωγής ελευθέρων ριζών στην καρκινική σειρά PC 12.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	11,13359	4	2,783398	2,287715	0,131568	3,47805
Υπόλοιπο	12,16671	10	1,216671			
Σύνολο	23,3003	14				

Η συσχέτιση μεταξύ μάρτυρα και πρωτεϊνών από το φυτό είναι αρνητική, ενώ σχετικά θετική είναι για αυτές που προέρχονται από τον κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα).

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά των φυσιολογικών κυττάρων (VERO) φαίνεται ότι οι περισσότερες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προκαλούν μεγαλύτερη αύξηση της συσσώρευσης των E.P. από ότι παρατηρείται στον μάρτυρα, ενώ για την συγκέντρωση 10 ng/ml του φυτού ιξού παρατηρείται η μικρότερη τιμή. Με άλλα λόγια, οι πρωτεΐνες που παρήχθησαν από τις in vitro καλλιέργειες επέδειξαν μεγαλύτερη ικανότητα πρόκλησης E.P. στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά από ότι οι πρωτεΐνες του φυτού.

Διάγραμμα 59: Μέτρηση ελεύθερων ριζών κυττάρων σε κύτταρα της καρκινικής σειράς VERO (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού)



Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής ανάλυσης (Πίνακας 50), όπου εξάγεται το συμπέρασμα ότι η επίδραση των διαφόρων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στη σειρά VERO δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 50: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης επαγωγής ελεύθερων ριζών στην καρκινική σειρά VERO.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	11,14811	4	2,787028	2,290698	0,131222	3,47805
Υπόλοιπο	12,16672	10	1,216672			
Σύνολο	23,31483	14				

Η συσχέτιση μεταξύ μάρτυρα και φυτού ιξού είναι και πάλι αρνητική (όπως και για την καρκινική σειρά που δοκιμάστηκε), ενώ η σχέση μάρτυρα και των κάλων του ιξού είναι θετική, παρά την έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα).

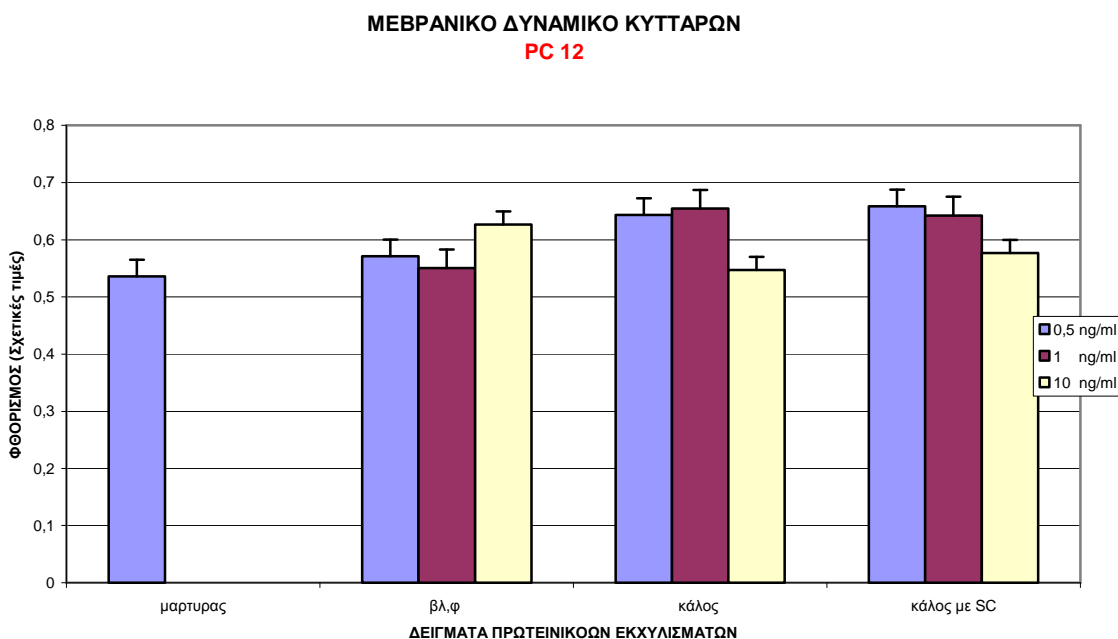
4.8.3. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων

Μελετήθηκαν ακόμα οι μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό των ίδιων κυτταρικών σειρών, δηλαδή της καρκινικής PC12 και της φυσιολογικής VERO. Οι μεταβολές αυτές αντιπροσωπεύουν την επίδραση των πρωτεϊνών του ιξού (παραθθέντων in vivo ή in vitro) στην ακεραιότητα της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης και της αυξημένης ή όχι περατότητας αυτής (όπου η αύξηση υποδεικνύει πιθανή βλάβη).

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 60, η εφαρμογή των πρωτεϊνών του ιξού επηρέασε αρνητικά την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης της σειράς PC12,

όπως καταδεικνύεται από τη θετική αύξηση του μεμβρανικού δυναμικού (αποπόλωση μεμβράνης). Οι μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης παρατηρούνται στα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης προερχόμενη από το φυτό (βλ. φ.), και σε αυτά με μικρότερες συγκεντρώσεις από τους κάλους (0,5 και 1 ng/ml). Ωστόσο οι διαφορές με τον μάρτυρα, αν και εμφανείς, είναι μικρές και μη στατιστικώς σημαντικές, όπως φαίνεται στον Πίνακα 51.

Διάγραμμα 60: Μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό κυττάρων της κυτταρικής σειράς PC 12 (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού).



Πίνακας 51.: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης μεταβολών μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων στην καρκινική σειρά PC 12.

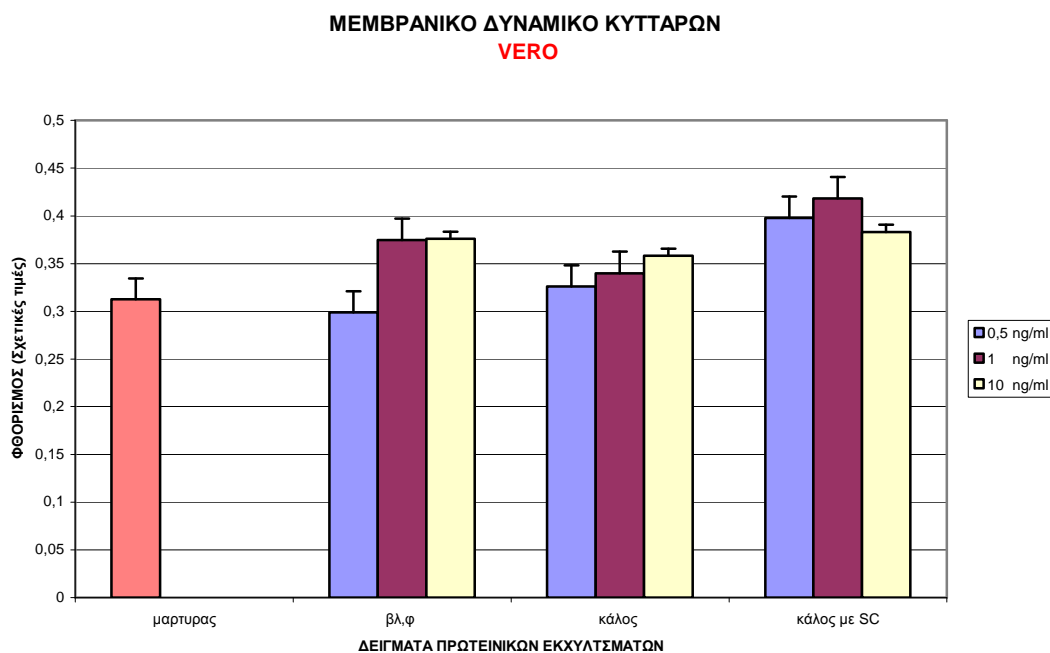
Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,014533	3	0,004844	2,813469	0,107611	4,06618
Υπόλοιπο	0,013775	8	0,001722			
Σύνολο	0,028308	11				

Ο πίνακας συσχέτισης δείχνει ότι η σχέση μάρτυρα και φυτού ιξού είναι θετική, ενώ η σχέση με τους κάλους αρνητική (αντιστρόφως ανάλογη) (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα Πινάκων).

Κατά παρόμοιο τρόπο, η εφαρμογή των πρωτεϊνών του ιξού επηρέασε αρνητικά την ακεραιότητα των μεμβρανών των κυττάρων της σειράς VERO, όπως καταδεικνύεται από τη θετική αύξηση του μεμβρανικού δυναμικού (αποπόλωση μεμβράνης) (Διάγραμμα 61). Οι μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης παρατηρούνται στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους σωμακλωνικά παραλλαγμένους κάλους, πάντα σε εξάρτηση από τη συγκέντρωση. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα τα οποία

παρατηρήθηκαν στη σειρά PC12, τα αποτελέσματα των επεμβάσεων στη σειρά VERO είναι στατιστικά σημαντικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 52.

Διάγραμμα 61: Μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό κυττάρων της κυτταρικής σειράς VERO (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού).



Πίνακας 52: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης μεταβολών μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων στην καρκινική σειρά VERO.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,011865	3	0,003955	6,293369	0,016845	4,06618
Υπόλοιπο	0,005027	8	0,000628			
Σύνολο	0,016892	11				

Η συσχέτιση μεταξύ των τιμών που προκύπτουν για τις διάφορες επεμβάσεις δείχνει ότι η σχέση μάρτυρα με το φυτό ιξού και τον κάλο με SC έχουν θετική σχέση, ενώ με τον κάλο ιξού αρνητική (αντιστρόφως ανάλογη) (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα Πινάκων).

4.8.4. Απομόνωση μιτοχονδρίων

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης των επιδράσεων πρωτεϊνών του ιξού στη λειτουργία απομονωμένων μιτοχονδρίων των κυτταρικών

σειρών που μελετήθηκαν προηγούμενα, δηλαδή της καρκινικής PC12 και της φυσιολογικής VERO.

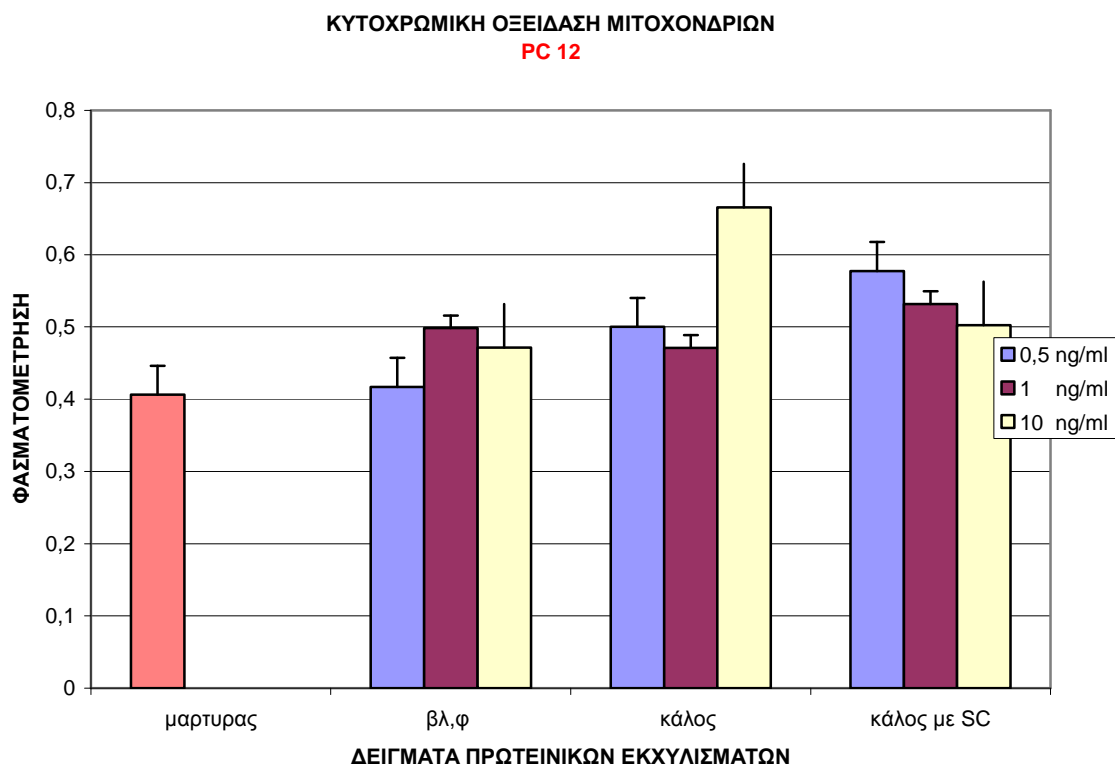
4.8.4.1. Βιοδοκιμές κυτοχρωμικής οξειδάσης C

Η πρώτη παράμετρος η οποία μελετήθηκε αφορούσε την έξω-μιτοχονδριακή δράση της κυτοχρωμικής οξειδάσης C, η *αύξηση* της οποίας συνδέεται με *μειωμένη* λειτουργία των μιτοχονδρίων και *αυξημένη* αποπτωτική πορεία του κυττάρου.

Όσον αφορά την καρκινική σειρά PC12, η εφαρμογή των πρωτεϊνών του ιξού συσχετίστηκε με αύξηση της κυτοπλασματικής συγκέντρωσης της κυτοχρωμικής οξειδάσης και επομένως με την πρόκληση αποπτωτικών διαδικασιών στα κύτταρα αυτά (Διάγραμμα 62). Η μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης παρατηρείται για την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος που προέρχεται από τον απλό κάλο (χωρίς σωμακλωνική παραλλακτικότητα). Ωστόσο οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων δεν είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 50). Η ανάλυση συσχέτισης δείχνει ότι ο μάρτυρας έχει αρνητική συσχέτιση με την εφαρμογή αυξανόμενων συγκεντρώσεων από τον κάλο ιξού (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα).

Διάγραμμα 62: Ενεργότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης C στην κυτταρική σειρά PC

12.

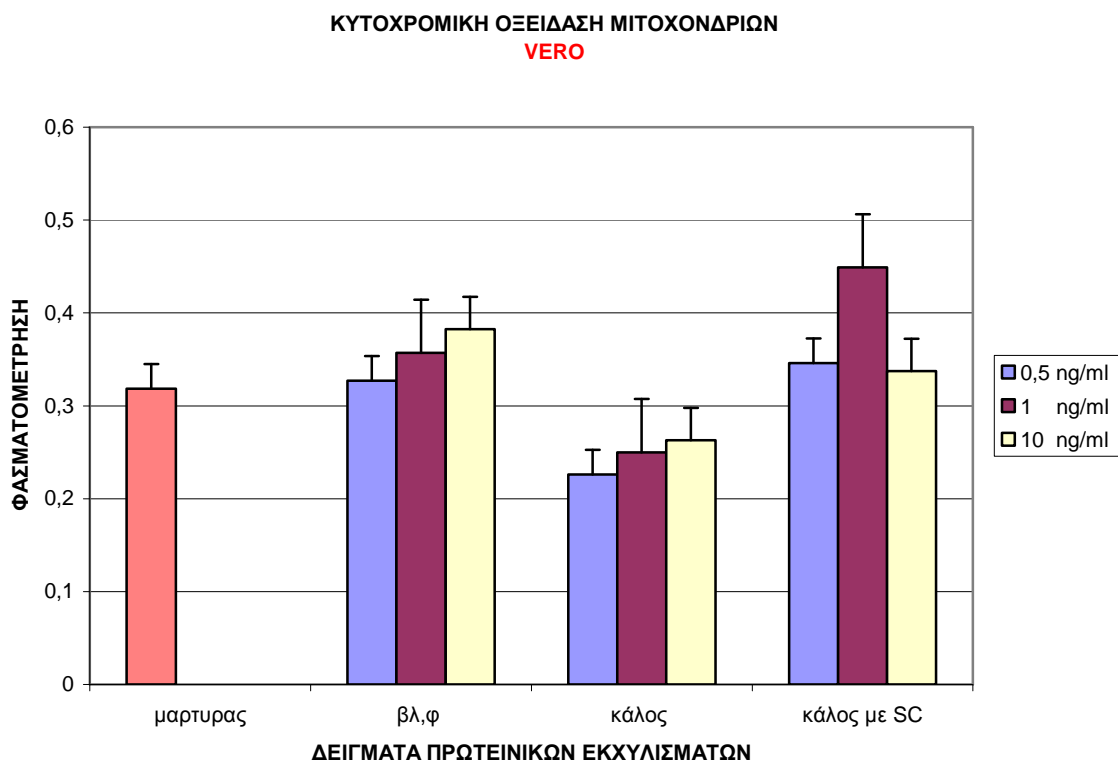


Πίνακας 53: Στατιστική ανάλυση της ενεργότητας της κυτοχρωμικής οξειδάσης C στην κυτταρική σειρά PC 12.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,039282	3	0,013094	3,692115	0,061969	4,06618
Υπόλοιπο	0,028372	8	0,003546			
Σύνολο	0,067654	11				

Αντίθετα, στην κυτταρική σειρά VERO, οι διαφορές που προκύπτουν είναι στατιστικά σημαντικές. Με άλλα λόγια, η εφαρμογή πρωτεϊνών του ιξού επέδρασε σημαντικότερα στην αύξηση της κυτοπλασματικής συγκέντρωσης της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Διάγραμμα 63, Πίνακας 54). Ωστόσο η επίδραση αυτή αφορούσε μόνο τις πρωτεΐνες που προήλθαν είτε από το φυτό ή τους σωμακλωνικά παραλλαγμένους κάλους, με τη μεγαλύτερη επίδραση να παρατηρείται στη συγκέντρωση 1 ng/ml του σωμακλωνικού κάλου ιξού. Αντίθετα, η εφαρμογή πρωτεϊνών από το φυσιολογικό κάλο οδήγησε σε μειωμένη συγκέντρωση κυτοχρωμικής οξειδάσης στο κυτταρόπλασμα, επομένως σε μεγαλύτερη προστασία των κυττάρων από την απόπτωση. Η ανάλυση συσχέτισης δείχνει ότι η συσχέτιση μεταξύ μάρτυρα, κάλου ιξού και φυτού είναι θετική, ενώ με τον κάλο ιξού αρνητική (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα).

Διάγραμμα 63: Ενεργότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης C στην κυτταρική σειρά VERO.



Πίνακας 54: Στατιστική ανάλυση της ενεργότητας της κυτοχρωμικής οξειδάσης C στην κυτταρική σειρά VERO.

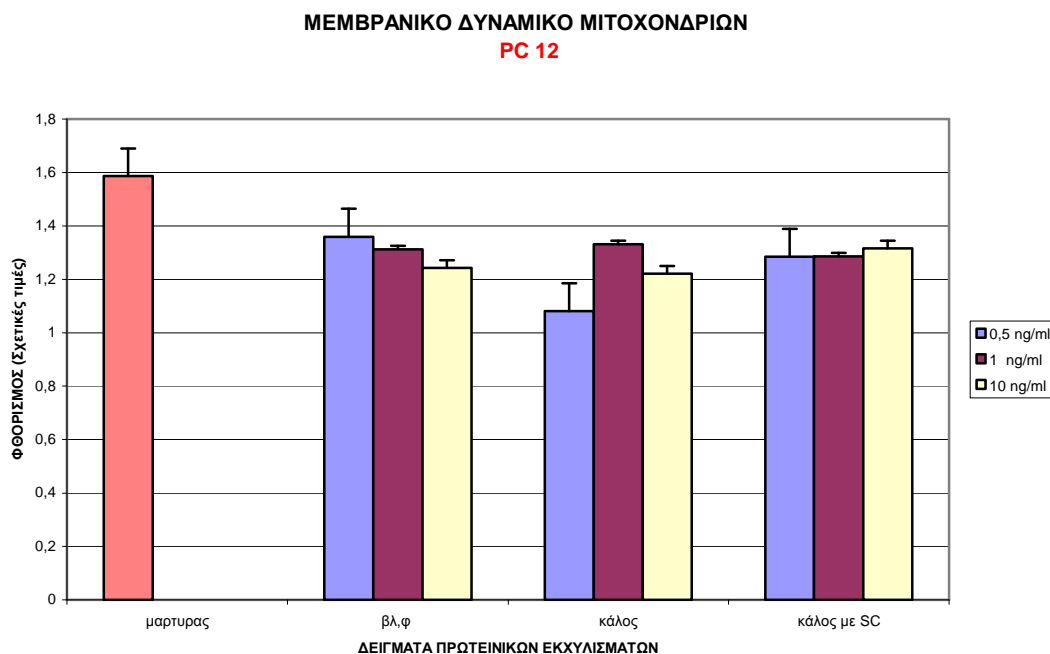
Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,029709	3	0,009903	7,949562	0,008755	4,06618
Υπόλοιπο	0,009966	8	0,001246			
Σύνολο	0,039675	11				

4.8.4.2. Βιοδοκιμές μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων

Η δεύτερη παράμετρος η οποία διερευνήθηκε αφορούσε τις μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό απομονωμένων μιτοχονδρίων από τις ίδιες κυτταρικές σειρές οι οποίες μελετήθηκαν προηγούμενα, δηλαδή την καρκινική PC12 και τη φυσιολογική VERO. Οι μεταβολές αυτές αντιπροσωπεύουν την επίδραση των πρωτεϊνών του ιξού (παραχθέντων *in vivo* ή *in vitro*) στην ακεραιότητα της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και ιδιαίτερα στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Στην καρκινική κυτταρική σειρά PC12 παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική *αλγεβρική μείωση* του μεμβρανικού δυναμικού (*υπερπόλωση μεμβράνης*) (Διάγραμμα 64, Πίνακας 55) με την εφαρμογή των πρωτεϊνών του ιξού, επομένως και *αύξηση* της λειτουργικότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στη μικρότερη συγκέντρωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τους φυσιολογικούς κάλους. Βέβαια, η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τις μεταβολές της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Διάγραμμα 62).

Διάγραμμα 64: Μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό μιτοχονδρίων της κυτταρικής σειράς PC 12 (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού).



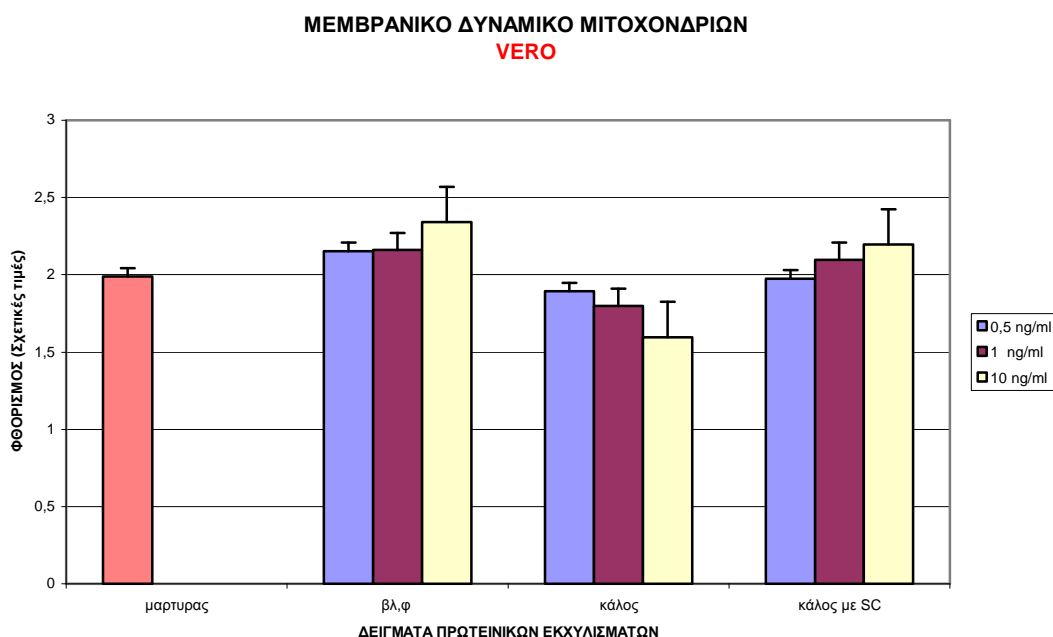
Πίνακας 55.: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης μεταβολών μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων στην καρκινική σειρά PC 12.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,238782	3	0,079594	16,18401	0,000928	4,06618
Υπόλοιπο	0,039345	8	0,004918			
Σύνολο	0,278127	11				

Η ανάλυση συσχέτισης δείχνει ότι η συσχέτιση μεταξύ μάρτυρα και φυτού είναι αρνητική ενώ μάρτυρα και κάλων θετική (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα Πινάκων).

Από την άλλη πλευρά, στη φυσιολογική κυτταρική σειρά VERO παρατηρήθηκε είτε μία στατιστικά σημαντική *αλγεβρική μείωση* του μεμβρανικού δυναμικού (*υπερπόλωση μεμβράνης*) (Διάγραμμα 65, Πίνακας 56) με την εφαρμογή των πρωτεϊνών του φυσιολογικού κάλου ιξού, ή μία μικρή θετική αύξηση του δυναμικού (*αποπόλωση = δυσλειτουργία μεμβράνης*) με την εφαρμογή των πρωτεϊνών του σωμακλωνικού κάλου ή του φυτού του ιξού. Σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά PC12, η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με τις μεταβολές της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Διάγραμμα 63), επομένως φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες του φυσιολογικού κάλου του ιξού προστατεύουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς. Η ανάλυση συσχέτισης για τον μάρτυρα δείχνει ότι είναι έχει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών από το φυτό και τον κάλο, ενώ αρνητική με τις πρωτεΐνες από τον κάλο με SC (αναλυτικά αποτελέσματα στο Παράρτημα Πινάκων).

Διάγραμμα 65: Μεταβολές στο μεμβρανικό δυναμικό μιτοχονδρίων της κυτταρικής σειράς VERO (εκφρασμένη ως εκπομπή φθορισμού).



Πίνακας 56.: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης μεταβολών μεμβρανικού δυναμικού μιτοχονδρίων στην καρκινική σειρά VERO.

Πηγή παραλλακτικότητας	AT	BE	MT	F	P-value	F crit
Επεμβάσεις	0,333371	3	0,111124	9,547206	0,005079	4,06618
Υπόλοιπο	0,093115	8	0,011639			
Σύνολο	0,426486	11				

Συνοψίζοντας, συνεκτιμώντας τα αποτελέσματα της μελέτης των βιοχημικών επιδράσεων των διαφόρων πρωτεϊνικών κλασμάτων του ιξού και των υπολοίπων βιοδοκιμών, διαπιστώνουμε μία κατά κανόνα αρνητική επίδραση αυτών (και κυρίως όσων έχουν παραχθεί από φυσιολογικούς κάλους) στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τουλάχιστον όσον αφορά την πιθανή πρόκληση αποπτωτικών φαινομένων στην καρκινική κυτταρική σειρά PC12. Αντίθετα, στη φυσιολογική σειρά VERO οι αρνητικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν μόνο μετά την εφαρμογή των πρωτεϊνών είτε του φυτού ή του σωμακλωνικά παραλλαγμένου κάλου.

Οι επιδράσεις αυτές δεν φάνηκε να έχουν σχέση με την επαγωγή ελευθέρων ριζών στις δύο κυτταρικές σειρές (παράμετρος η οποία δεν συσχετίστηκε ούτε με την τοξικότητα), ενώ παρατηρήθηκε μία μικρή σχέση με την επίδραση των πρωτεϊνών στη λειτουργία του πλασμαλήμματος.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη για την δυνατότητα ιστοκαλλιέργειας του *Viscum album* στέφθηκε με επιτυχία, αφού παρά τις δυσκολίες που υπήρξαν (δοκιμασία πολλών πρωτοκόλλων απολύμανσης, μικρή ποσοστιαία παραγωγή κάλων, «μαύροι» κάλοι, όχι ανταπόκριση όλων των εκφύτων στην ιστοκαλλιέργεια, εξαρτώμενη παραγωγή κάλων από πάρα πολλούς παράγοντες, όπως κι από την εποχή της συλλογής του εκφύτου), τελικά έγινε εφικτή η ιστοκαλλιέργεια του ιξού, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες οι οποίες καθορίστηκαν για το συγκεκριμένο φυτό, για πρώτη φορά, μέσα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη. Αντιμετωπίστηκαν οι δυσκολίες και δόθηκαν λύσεις, ώστε να καθοριστεί το τελικό πρωτόκολλο για την δημιουργία κάλων από το φυτό του ιξού.

Έτσι, η απολύμανση των εκφύτων του ιξού καθορίστηκε να γίνεται αρχικά με υποχλωριώδες νάτριο για 15 λεπτά κι έπειτα με χλωριούχο υδράργυρο για 12 λεπτά. Ο συνδυασμός αυτός, αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός για την απολύμανση των συγκεκριμένων εκφύτων, πετυχαίνοντας προστασία από μολύνσεις και αποφυγή των νεκρωτικών κηλίδων.

Από τα διάφορα μέρη του φυτού που καλλιεργήθηκαν άλλα ανταποκρίθηκαν περισσότερο κι άλλα λιγότερο. Τα φύλλα κι οι βλαστοί, ιδιαίτερα τα νεαρά, ανταποκρίθηκαν περισσότερο και καλύτερα στις διάφορες καλλιεργητικές επεμβάσεις, ενώ οι ανθήρες κι οι καρποί ελάχιστα έως καθόλου. Όσον αφορά την περίοδο ανάπτυξης του φυτού, μόνο έκφυτα που προήλθαν από το χειμερινό ιξό ανταποκρίθηκαν στις συνθήκες καλλιέργειας, αντίθετα με τα καλοκαιρινά τα οποία απότυχαν τελείως να παράγουν κάλους.

Ανεξάρτητα με τον ρυθμιστή αύξησης που χρησιμοποιήθηκε, στους κάλους που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς ασκορβικό οξύ, παρατηρήθηκε χρώμα καφέ. Τα έκφυτα ανέπτυξαν περιοχές που έμοιαζαν με αυτές που αναπτύσσουν οι νεκρωτικές κηλίδες, οι οποίες όμως δεν επηρέασαν την ανάπτυξη των εκφύτων, παρ' όλο που οι νεκρωτικές κηλίδες συνήθως καταδεικνύουν την καταπόνηση των καλλιεργειών και οδηγούν ακόμη και σε θάνατο τον κάλο.

Αυτό που παρατηρήθηκε όμως είναι ότι, ανάλογα με την σύνθεση του καλλιεργητικού μέσου, σχηματίστηκαν κάλοι σε ποσοστό 2-16% των αλλοιωμένων εκφύτων και αυξήθηκαν περαιτέρω (Εικόνα 9). Οι κάλοι αυτοί διατήρησαν το σκούρο χρώμα τους (καφέ μαύρο) ακόμη και μετά από επαναλαμβανόμενες μεταφυτεύσεις.

Η προσθήκη 10 mg L^{-1} ασκορβικού οξέος αύξησε την παραγωγή κάλων (13-45%) (Εικόνα 9) ($p < 0.0001$, Πίνακας 21). Οι κάλοι αυτοί έδειξαν ένα λευκό-ροζ χρώμα (Εικόνα 7) και υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού κάλων (εκφραζόμενο σε νωπό βάρος κάλων) (Εικόνες 8, και 19) ($p < 0.001$). Παρ' όλα αυτά όμως το ασκορβικό οξύ δεν έδειξε να αυξάνει το ξηρό βάρος. Ο Fukui et al. (Fukui, 1990) παρατήρησαν επίσης σε κάλους του συγκεκριμένου φυτικού είδους αυτό το λευκό-ροζ χρώμα. Η προσθήκη του ασκορβικού οξέος στο θρεπτικό υπόστρωμα (σε άριστη συγκέντρωση αυτήν των 10 mg L^{-1}) μείωσε στατιστικά σημαντικά την εμφάνιση νεκρωτικών συμπτωμάτων στην ιστοκαλλιέργεια ιστών του είδους *S. officinalis* και *S. fruticosum* (Kintzios et al., 1998), παρ' όλο που, ακόμη και σε αυτούς που ήταν καφέ, δεν εμφανίστηκε παρεμπόδιση της σωματικής εμβρυογένεσης.

Η παραγωγή κάλου στο υπόστρωμα με ασκορβικό, παρατηρήθηκε μετά από δύο εβδομάδες και στο υπόστρωμα χωρίς αυτό μετά από πέντε εβδομάδες. Και στις δύο περιπτώσεις η παραγωγή και ο πολλαπλασιασμός κάλου εξαρτάται από τους

ρυθμιστές αύξησης που προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα και τον συνδυασμό αυτών, καθώς κι από το είδος του εκφύτου (φύλλο, βλαστός) ($p < 0.0001$, Πίνακας 21A). Τα έκφυτα βλαστών παράγουν περισσότερους από ότι τα φύλλα (Εικόνες 9 και 21), ενώ οι κάλοι από τα φύλλα μεγαλώνουν γρηγορότερα (Εικόνες 19, 20, και 21). Στο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ασκορβικό οξύ, καλύτερο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν αυτό που περιείχε NAA, το οποίο ήταν ο ρυθμιστής αύξησης για την παραγωγή κάλων από βλαστούς, ενώ για τα φύλλα ήταν ο συνδυασμός NAA και BA (Εικόνα 21). Και για τους δύο τύπους εκφύτων το υψηλότερο νωπό βάρος παρατηρήθηκε στον συνδυασμό 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA. Μόνο η επίδραση των NAA + Kinetin στο ξηρό βάρος των κάλων από βλαστό ήταν ανώτερο από των NAA + BA. Αυτή η επίδραση ήταν ακόμη καλύτερη με την προσθήκη του ασκορβικού οξέος, η οποία γενικά βελτίωσε την παραγωγή κάλων. Οι Fukui et al. (Fukui, 1990) χρησιμοποίησαν ένα μισής δράσης θρεπτικό υπόστρωμα MS με την προσθήκη NAA και κινετίνη για την παραγωγή κάλων από το *V. album* var. *lutescens*. Η χρήση του MS, που περιέχει διάφορα άλατα σε υψηλές συγκεντρώσεις, πιθανά είναι προτιμητέο για την ιστοκαλλιέργεια του, ο παρασιτισμός του οποίου προσφέρει ειδική προσαρμογή στην ανόργανη θρέψη (Grieve, 1994; Becker, 1986).

Όσον αφορά τα υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων, παρατηρείται ότι σε ορισμένες μόνο μεταχειρίσεις ολιγοσακχαριτών (ημικυτταρινών και λιγνινών) προκάλεσαν την επαγωγή καλογένεσης στα έκφυτα του ιξού, (και μάλιστα σε πολύ χαμηλό ποσοστό) ακόμα και μετά παρέλευση 2 μηνών από την έναρξη της καλλιέργειας, σε πλήρη αντίθεση με το παράλληλα μελετηθέν σύστημα της μολόχας (όπου καταδεικνύεται θετική επίδραση όλων των εκχυλισμάτων στην επαγωγή καλογένεσης) (τα αναλυτικά συγκριτικά στοιχεία δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη). Η ανάπτυξη των κάλων ήταν εμφανώς κατώτερη του μάρτυρα και συγκρίσιμη με την επίδραση του οξικού νατρίου (Πίνακες 22 και 23A-23B). Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η επανάληψη του πειράματος με χρήση ολιγοσακχαριτών παραληφθέντων από το ημιπαρασιτικό αυτό είδος καθώς και ξενιστές του (π.χ. έλατο). Η εφαρμογή Alt-4 (προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ) προκάλεσε αυξημένη επαγωγή καλογένεσης και ανάπτυξης των κυτταροκαλλιεργειών σε σχέση με τα κλάσματα εκχύλισης του κενάφ, ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε αντίστροφη σχέση με τη συγκέντρωση της ουσίας και κατώτερα του μάρτυρα (Πίνακες 24A και 24B). Εξαίρεση αποτέλεσε η επαγωγή κάλων στις συγκεντρώσεις 1.5 – 3 mg/l Alt-4 σε σχέση με το μάρτυρα χωρίς ασκορβικό οξύ.

Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί ότι τα συγκεκριμένα κλάσματα ολιγοσακχαριτών παρουσίασαν μία ισχυρή φυτορυθμιστική δράση, η οποία ήταν ακόμα πιο έκδηλη στους χημικά ή ενζυμικά κατεργασθέντες ολιγοσακχαρίτες. Οι κυτταρικές παράμετροι που μελετήθηκαν κατέδειξαν τη σαφή προώθηση της μορφογένεσης *in vitro*. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί η υπόθεση των Meyer et al. (2007), σύμφωνα με την οποία το *V. album* έχει αναπτύξει μέσα από μία εξελικτική διαδικασία την ικανότητα να αξιοποιεί ουσίες των φυτών-ξενιστών με φυτορυθμιστικές ιδιότητες προς ίδιο όφελος, προσαρμόζοντας την επίδραση τους στο μεταβολισμό του μέσω της συμπλοκοποίησης του με τις ειδικές λεκτίνες του ιξού (σύμπλεγμα ML).

Το πείραμα της φωτοπερίοδου, απέδειξε ότι οι κάλοι που προήλθαν από το πρώτο εικοσιτετράωρο με φως (Αρχικά 24h φως), κι εξακολουθούν με φως, εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά καλογένεσης.

Όσον αφορά την περίοδο συγκομιδής, μόνο έκφυτα προερχόμενα από φυτά το χειμώνα ανταποκρίθηκαν στις καλλιεργητικές συνθήκες και η μεγαλύτερη

συγκέντρωση φρέσκου κάλου παρατηρήθηκε στον συνδυασμό 4.95 μM NAA+2.82 $\text{M}\mu$ BA. Περισσότεροι κάλοι παρήχθησαν από τα έκφυτα βλαστού, αλλά τα καλλιεργούμενα έκφυτα φύλλων έδωσαν γρηγορότερα κάλους. Η προσθήκη 10 mg L^{-1} ασκορβικού οξέος βελτίωσε την παραγωγή κάλων και την ανάπτυξή τους.

Με βάση τους πίνακες στατιστικής ανάλυσης των παραπάνω δεδομένων, ως τα καλύτερα υποστρώματα για την καλλιέργεια εκφύτων ιξού, επιλέχθηκαν αυτά με την προσθήκη 10 % ασκορβικού οξέος και 1 mg/l NAA στο υπόστρωμα για την καλλιέργεια των φύλλων και των βλαστών. Εστιάζοντας στα ποσοστά καλογένεσης από έκφυτα βλαστών, η προσθήκη 2 mg/l 2,4-D έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, τα οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την προσθήκη 1 mg/l NAA. Επιπλέον, και για την ομοιομορφία των πειραμάτων, επιλέχθηκε και για τους βλαστούς το υπόστρωμα με την προσθήκη 1 mg/l NAA.

Στους κάλους του ιξού παρατηρήθηκαν μερικές μοναδικές μορφολογικές δομές. Αυτές περιλαμβάνουν κιτρινωπές νηματώδεις προεξοχές, που καλύπτουν την επιφάνεια του κάλου σαν μούχλα (Εικόνα 8) και μερικές φορές προέρχονται από μικρές μαύρες σαν σπόρο δομές (Εικόνα 10), οι οποίες πιθανά συνδέονται με τον παρασιτισμό του φυτού. Τα σαν ρίζες νημάτια προέρχονται από έκφυτα βλαστών με περιορισμένη διαμόρφωση- σχήμα κάλου (Εικόνα 8).

Σωματικά έμβρυα παρατηρήθηκαν στο σφαιρικό στάδιο σε κάλους πάνω των τεσσάρων εβδομάδων, σε υπόστρωμα με ασκορβικό οξύ (Εικόνα 7). Αφού ο σχηματισμός δευτερογενών μεταβολιτών σε πλήρη φυτά εξαρτάται από καλά καθορισμένη διαφοροποίηση, είναι πιθανό ότι τα σωματικά έμβρυα του ιξού, τα οποία δείχνουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης ιστών, θα μπορούσαν να συσσωρεύουν διάφορα βιοενεργά συστατικά.

Η επιτυχής παραγωγή κάλου και σωματικής εμβρυογένεσης από έκφυτα ιξού είναι το πρώτο βήμα για την *in vitro* παραγωγή σταθερά καθορισμένων εκχυλισμάτων των κυτοτοξικό/ανοσορρυθμιστικών πρωτεϊνών του φυτού. Η ιστοκαλλιέργεια έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αντικαρκινικών παραγόντων από άλλα είδη, όπως το *Taxus canadensis* (Ketchum, 1999). Για παραγωγή μεγάλης κλίμακας, προτεραιότητα πρέπει να δοθεί στο σαφή καθορισμό των άριστων συνθηκών καλλιέργειας με περαιτέρω πρόοδο-βελτίωση της παραγωγής μορφολογικής και βιοχημικής αποδιαφοροποίησης στην ιστοκαλλιέργεια (όπως π.χ. μέσω της σωματικής εμβρυογένεσης).

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα έχει εκτενώς μελετηθεί σε σειρές φυτών όπως στο ζαχαροκάλαμο, στον καπνό, στο ρύζι, στο καλαμπόκι και στο κριθάρι (Larkin, 1981), όμως σπάνιες είναι οι αναφορές αυτής με εφαρμογές στα φαρμακευτικά φυτά. Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει πλατύ φάσμα διαφορών στην παραγωγή-απόδοση φυτοχημικών ουσιών εντός κλώνων που αποκτούνται από φυτικές κυτταρικές καλλιέργειες (Oksman-Caldentey, 1998). Επίσης, οι Oksman-Caldentey et al. (1987) παρατήρησαν σημαντική σωμακλωνική παραλλακτικότητα σε κυτταρικού κλώνους από πρωτοπλάστες του μεσόφυλλου του *Hyoscyamus muticus*. Οι κλωνικές σειρές περιείχαν ένα ελάχιστο υποπληθυσμό με σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε σκοπολαμίνη (300x) (scopolamine). Ο Zenk (1978) επίσης αναφέρει ότι 143 υποκλωνικοί κάλοι του *Solanum laciniatum* κατείχαν παραλλαγή στην ικανότητά τους να παράγουν αλκαλοειδή. Υπερπαραγωγή ενός φυτικού μεταβολίτη μπορεί να συνδεθεί με παραλλαγή στην μορφογένεση κάλου, όπως παρουσίασαν οι Hashimoto και Yamada (Hashimoto, 1983) για τον *Hyoscyamus niger*. Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι επίσης στενός κρίκος στην κυτταρική διαφοροποίηση: γι' αυτό είναι πιθανό ότι οι εμβρυογενείς κάλοι του ιξού, που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη και έδειξαν υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης,

μπορούν να παράγουν πρωτεΐνες του ιξού σε ικανοποιητικό ρυθμό. Η παρούσα εμφανιζόμενη σωμακλωνική παραλλακτικότητα, από πλευράς ποιοτικής και ποσοτικής παραγωγής πρωτεϊνών του ιξού, είναι σχετικά χαμηλή (8%), αλλά δείχνει για πρώτη φορά την πιθανότητα της *in vitro* παραγωγής σταθερών και καθορισμένων εκχυλισμάτων πρωτεϊνών με κυτοτοξικές και άνοσο-ρυθμιστικές ιδιότητες.

Η επιτυχής επαγωγή κάλων και σωματικών εμβρύων από αυτό το είδος (*Viscum album*) επιτρέπει μια δυναμική για την εφαρμογή της μεθόδου να διευκολύνει την *in vitro* παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών. Περαιτέρω πρόοδος στην σωματική εμβρυογένεση και άλλες πλεονεκτικές μεθόδους στην ιστοκαλλιέργεια (π.χ. καλλιέργεια πρωτοπλαστών και σύντηξη, δημιουργία τετραπλοειδών σειρών) θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντική ανάμιξη της βιοτεχνολογίας στη χρήση του ιξού σαν φαρμακευτικό φυτό - είδος.

Πειραματικά αποδείχθηκε ότι η συσσώρευση του συνόλου των μακροστοιχείων στις καλλιέργειες κάλων ιξού επηρεαζόταν σημαντικά τόσο από τους ρυθμιστές ανάπτυξης και την προέλευση του εκφύτου ($p < 0.05$), όσο και από την αλληλεπίδρασή τους.

Όσον αφορά την εφαρμογή 4.65 μM Kln (που ήταν ανώτερη άλλων ρυθμιστών ανάπτυξης), μπορεί να είναι αποτέλεσμα της σχετικά μικρότερης «αραίωσης» της περιεκτικότητας σε μέταλλα στις καλλιέργειες οι οποίες εκτέθηκαν στην επίδραση Kln μόνο, έναν ρυθμιστή ανάπτυξης ο οποίος είναι γνωστό ότι προάγει μάλλον την κυτταρική διαίρεση παρά την κυτταρική αύξηση, μέσω της πρόσληψης ύδατος (Torres, 1989). Επιπροσθέτως, η μέση *in vitro* συσσώρευση μεταλλικών στοιχείων ήταν μεγαλύτερη στις καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από βλαστούς σε σύγκριση με τις καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από φύλλα. Όσον αφορά την συσσώρευση P και Ca, τούτο μπορεί πιθανότατα να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης *in vivo* συγκέντρωσης σε βλαστούς ιξού.

Με εξαίρεση το Ca, η συσσώρευση μακροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλων προερχόμενων από βλαστούς συσχετιζόταν ισχυρά με τη συγκέντρωση επί ξηρού βάρους. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε αυτού του είδους η συσχέτιση στην περίπτωση των καλλιεργειών κάλων προερχόμενων από φύλλα.

Στην περίπτωση των προερχόμενων από βλαστούς κάλων, παρατηρήθηκε σημαντικά θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων K, P και Mg, ενώ η συσσώρευση Ca ήταν σχετικά υψηλή και συσχετιζόταν θετικά με το Mg ($r^2 = 0.802$, Πίνακας 28). Αντιθέτως, στις προερχόμενες από φύλλα καλλιέργειες παρατηρήθηκε σχετικά σημαντικά θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ των συγκεντρώσεων K και Mg ($r^2 = 0.848$). Χρησιμοποιώντας διακοσμητικά είδη φυτών, όπως το *Iris*, οι Pryce et al. (1994) έδειξαν ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις K και P σχετίζονταν θετικά και σημαντικά με την *in vitro* ανάπτυξη των καλλιεργειών.

Σε σύγκριση με τα φυτά ιξού και τους ξενιστές τους, οι καλλιέργειες κάλων αναμένεται να παρουσιάσουν μεγαλύτερη δραστηριότητα κυτταρικής διαίρεσης και αντιγραφής DNA. Με αυτή την έννοια, το Mg διαθέτει μια ουσιώδη λειτουργία ως στοιχείο σύζευξης για τη συσσώρευση των ριβοσωματικών μονάδων, μια διαδικασία η οποία είναι αναγκαία για την πρωτεϊνσύνθεση (Cammarano et al., 1972), καθώς και ως ρυθμιστικός παράγοντας για τη σύνθεση ATP (Marschner, 1995).

Βιβλιογραφικά, η κινετίνη διεγείρει τη μεριστωματική διαίρεση φυτικών κυττάρων, επομένως η *in vitro* συσσώρευση διαλυτού K και P ενδέχεται να επάχθηκε λόγω των αυξημένων ρυθμών πρωτεϊνικής σύνθεσης και μεταβολισμού (Guardia and Benloch, 1980, Tester and Blatt, 1989). Η χαμηλότερη συγκέντρωση P των προερχόμενων από φύλλα κάλων θα μπορούσε να αποδοθεί στη χαμηλότερη συγκέντρωση αυτού του στοιχείου στα φύλλα, κυρίως υπό τη μορφή φωσφορικών εστέρων και πλούσιων σε

ενέργεια φωσφορικών αλάτων. Τούτα αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα σε μεταβολικές οδούς βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης (Anderson and Beardall, 1991), οι οποίες επίσης κινητοποιούνται κατά την κυτταρική διαίρεση.

Το ασκορβικό οξύ θα μπορούσε να έχει προάγει τη συσσώρευση K, P και Mg επάγοντας συγκεκριμένες μεταβολικές οδούς, όπως η παραγωγή ATP από τα μιτοχόνδρια, η οποία απαιτεί τη συμμετοχή αυτών των μακροστοιχείων κατά απόλυτο τρόπο (Guardia and Benloch, 1980, Tester and Blatt, 1989, Anderson και Beardall, 1991, Marschner, 1995). Οι αυξημένες συγκεντρώσεις Ca σε κάλους φύλλων μπορεί να σχετίζονται με προστατευτικές αντιοξειδωτικές επιδράσεις σε μεμβρανικά λιπίδια. Αφού το ασκορβικό οξύ είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, το οποίο εμποδίζει τη φαινολική οξείδωση στις καλλιέργειες κάλων ιξού (Kintzios and Barberaki, 2000), η προσθήκη του στο καλλιεργητικό μέσο θα μπορούσε να εξαλείψει την ανάγκη υψηλών επιπέδων ενδοκυττάρου Ca.

Τέλος, το ασκορβικό οξύ μπορεί να προήγαγε τη συσσώρευση των μακροστοιχείων μέσω αυξημένης ανάπτυξης των καλλιεργειών: όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Kintzios and Barberaki, 2000), η προσθήκη ασκορβικού οξέος αποτελεί απόλυτη προϋπόθεση για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης στις καλλιέργειες ιστού και σχετίζεται με αξιοσημείωτη (έως και τριπλάσια) αύξηση του ξηρού βάρους καλλιέργειας.

Παρουσιάζεται διακύμανση στη συσσώρευση μακροστοιχείων στα διάφορα υποστρώματα ιξού (έκφυτο βλαστός), αλλά αυτή δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική, όπως επίσης κι η *in vitro* συσσώρευση πρωτεΐνης σε σχέση με τη συσσώρευση μακροστοιχείων.

Οι Murphy et al. (1994) κατέγραψαν μια αρχική μείωση της *in vitro* συγκέντρωσης των (θρεπτικών) στοιχείων σε καλλιέργειες δελφινίου κατά τη διάρκεια περιόδου καλλιέργειας 7 εβδομάδων, η οποία ακολουθήθηκε από μια αύξηση προς το τέλος της περιόδου επώασης. Απέδωσαν αυτή την επίδραση στην «αραίωση» της περιεκτικότητας σε μέταλλα στις καλλιέργειες, οι οποίες, πιθανώς, αναπτύσσονταν ταχύτερα σε σχέση με την πρόσληψη μετάλλων.

Είναι αδύνατον να σχολιάσουμε τα αποθέματα θρεπτικών στοιχείων στα συστήματα καλλιεργειών κάλων χωρίς να αναλογιστούμε τους ενεχόμενους χημικούς, φυσικούς και βιολογικούς παράγοντες. Όταν ασχολούμαστε με τον εφοδιασμό του καλλιεργητικού μέσου με θρεπτικά στοιχεία, πρέπει να θυμόμαστε ότι *in vitro* τα φυτά δεν έχουν πρόσβαση σε ολόκληρο τον όγκο του καλλιεργητικού μέσου. Για παράδειγμα, έως και 50% του Fe και 13% του P μπορεί να καθιζάνει στο διάλυμα εντός 7 ημερών (Debergh et al., 1994). Η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων περιορίζεται περαιτέρω από την υδροδυναμική του καλλιεργητικού μέσου (-0.7 Μρα για το καλλιεργητικό μέσο MS), η οποία είναι κατά πολύ μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη του εδάφους υπό φυσιολογικές συνθήκες. Όσον αφορά τον ιξό, αυτή η διαδικασία να περιπλεχθεί περαιτέρω λόγω της ημι-παρασιτικής φύσης αυτών των ειδών.

Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη δίνει την δυνατότητα πληροφόρησης όσον αφορά την πιθανή σχέση μεταξύ των μετάλλων και των καλλιεργειών ιξού *in vitro*. Τα αποτελέσματα δείχνουν τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συσσώρευσης μακροστοιχείων, της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου. Από πρακτικής άποψης, τούτο μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση των υπάρχοντων καλλιεργητικών μέσων και πρωτοκόλλων καλλιεργειών προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ανάπτυξη κάλων χωρίς να βλάπτεται η ποιότητα του προϊόντος, π.χ. καλλιεργώντας έκφυτα από βλαστούς σε καλλιεργητικό μέσο εμπλουτισμένο με κινετίνη και ασκορβικό οξύ για τουλάχιστον δέκα εβδομάδες.

Παρατηρείται ότι η μέγιστη συσσώρευση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων σε κάλους από καλλιέργειες βλαστών ιξού, παρουσιάζεται με την προσθήκη 4.65 mM Kin. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη σχετικά μικρότερη «αραίωση» των περιεχομένων μεταλλικών αλάτων στις καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε μόνο κινετίνη, ένας ρυθμιστής της ανάπτυξης ο οποίος είναι γνωστό ότι προάγει την κυτταρική διαίρεση και όχι τη διόγκωση των κυττάρων με πρόσληψη ύδατος.

Στις καλλιέργειες με έκφυτα φύλλων παρατηρείται αυξημένη σε Fe. Η συσσώρευση σιδήρου στις καλλιέργειες από φύλλα θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη διατήρηση των χλωροπλαστών, λόγω της συμμετοχής του Fe στο σύμπλεγμα Fe-υπεροξειδοδισμουτάσης (FeSOD) (Lovatt, 1985), το οποίο αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου σχηματίζοντας H_2O_2 . Ωστόσο, είναι πιθανότερο ότι αυτή η αποτρεπτική δραστηριότητα εμπλέκει και άλλα κυτταρικά οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια και υπεροξειδισώματα, αφού δεν είναι ακόμη γνωστό αν τα κύτταρα ιξού φωτοσυνθέτουν (έστω μερικώς) *in vitro*. Διαφορετικές μορφές SOD μπορεί επίσης να περιέχουν Cu, Mn και Zn, η ιδιαίτερη συσσώρευση των οποίων έχει επίσης δείχθει υπό συνθήκες έντονης ανάπτυξης *in vitro*. Πράγματι, τα φύλλα διαθέτουν πολυπληθέστερα, σε σχέση με τους βλαστούς, μεσοφυλλικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν εντονότερη τάση για διαίρεση και επιμήκυνση *in vitro*. Η εφαρμογή NAA (σε συνδυασμό με BA ή Kin) θα μπορούσε να προάγει αυτή τη δραστηριότητα και ταυτόχρονα να αυξάνει τη συσσώρευση μεταλλικών συμπαραγόντων απαραίτητων για την επίτευξη ικανοποιητικού ρυθμού ανάπτυξης. Για παράδειγμα, το Mn ενεργοποιεί 35 διαφορετικά ένζυμα (Burnell, 1988) τα οποία καταλύουν οξειδοαναγωγικές, αποκαρβοξυλιωτικές και υδρολυτικές αντιδράσεις. Επιπροσθέτως, το Mn ενεργοποιεί ένζυμα της οδού του σικιμικού οξέος, διεγείροντας έτσι τη βιοσύνθεση φαινολικών ενώσεων και αυξίνης - ινδολοξικού οξέος (IAA), το οποίο εμπλέκεται άμεσα στη διαίρεση και επιμήκυνση των φυτικών κυττάρων. Όμοια συμπεράσματα θα μπορούσαν να εξαχθούν για άλλους μικροδιατροφικούς παράγοντες, ειδικά εκείνους που συμμετέχουν στις μορφές της SOD και /ή επηρεάζουν τον μεταβολισμό των φαινολών.

Σε καλλιέργειες κάλου από έκφυτα βλαστών, η συσσώρευση των μικροστοιχείων συσχετιζόταν ισχυρά με τη συγκέντρωση επί του ξηρού βάρους, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες κάλου από έκφυτα φύλλων. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της παρατήρησης μπορεί και πάλι να είναι ότι τα φύλλα φέρουν πολυπληθέστερα μεσοφυλλικά κύτταρα σε σχέση με τους βλαστούς.

Η υψηλή θετική συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ των κάλων από καλλιέργειες εκφύτων φύλλων και των συγκεντρώσεων Mn και Cu, θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί σε αντισταθμιστικό μηχανισμό μεταξύ CnZnSOD και MnSOD (Marschner, 1995). Έχει ανακοινωθεί (Kintzios et al., 2001), η ευεργετική επίδραση αυξημένων συγκεντρώσεων Cu στην έναρξη καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού σωματικών εμβρύων από νέα, ώριμα, πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα ρόδου (*Rosa hybrida* L.). Τα ιόντα χαλκού βρίσκονται στο ενεργό κέντρο μιας πληθώρας ενζύμων, αποτελώντας θέση αντίδρασης με το O_2 και συμμετέχοντας σε ποικιλία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (Marschner, 1995). Επειδή ο χαλκός αποτελεί επίσης συστατικό της Cu-Zn - υπεροξειδοδισμουτάσης, εμπλέκεται άμεσα στο μηχανισμό αποτοξίνωσης του O_2 το οποίο παράγεται με τη φωτοσύνθεση (Elstner, 1982). Συσσώρευση Cu θα μπορούσε να προάγει τη δημιουργία κάλου και τη σωματική εμβρυογένεση μέσω άμεσης ευόδωσης της βιοσύνθεσης πολυαμινών. Η διαμινοξειδάση είναι μια φλαβοπρωτεΐνη περιέχουσα χαλκό η οποία καταλύει τη διάσπαση πολυαμινών, όπως η σπερμιδίνη προς σχηματισμό πιτρεσκίνης (Federico et al, 1990). Αυξημένα επίπεδα

πιτρεσκίνης και σπερμιδίνης έχουν παρατηρηθεί κατά τη σωματική εμβρυογένεση ποικίλων ειδών φυτών (Montague et al., 1978; Fienberg et al., 1984; Gaspar et al., 1996). Ο Dahleen (1995) έχει αναφέρει ότι τα αυξημένα επίπεδα Cu συσχετίζονταν με βελτιωμένη επαγωγή δημιουργίας κάλου και φυτική αναγέννηση από σωματικά έμβρυα κριθαριού. Τέλος, ο Cu αποτελεί συστατικό της οξειδάσης του ασκορβικού οξέος, η οποία καταλύει την οξειδωση του ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ (Marschner, 1995).

Δείξαμε ότι σε καλλιέργειες κάλου από ιξό (*V. album* L.) οι συσσωρευμένοι μικροδιατροφικοί παράγοντες *in vitro* εξαρτώνται τόσο από την προέλευση του εκφύτου (βλαστός ή φύλλα) όσο και από το είδος και τη συγκέντρωση των ρυθμιστών της αύξησης. Επιπλέον, μπορέσαμε να δείξουμε ότι η συσσώρευση *in vitro* των Fe, Mn, Zn και Cu υπερέβη σημαντικά την παρατηρούμενη συγκέντρωση στα φυτά του ιξού και στους ξενιστές αυτού, όπως το έλατο, η δρυς και η καστανιά. Το σχήμα συσσώρευσης των μικροδιατροφικών παραγόντων είναι πιθανό να σχετίζεται με την ανάπτυξη του κάλου μέσω ενός μηχανισμού στον οποίο εμπλέκονται αντιοξειδωτικοί παράγοντες, όπως το ασκορβικό οξύ και οι μορφές της SOD και /ή μέσω επίδρασης στο μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων. Από πρακτικής άποψης, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων δημιουργίας κυτταρικών παραγωγικών συστημάτων, καθώς και για την περαιτέρω διερεύνηση της ημιπαρασιτικής βιολογίας αυτού του σημαντικού από φαρμακολογικής άποψης είδους.

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος αποτελεί απόλυτη προϋπόθεση για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης από καλλιέργειες ιξού (Kintzios and Barberaki, 2000). Επιπροσθέτως, το ασκορβικό οξύ, βελτιώνει σημαντικά την επαγωγή δημιουργίας και ανάπτυξης κάλου και συσχετίζεται με το σχηματισμό ροδόλευκου κάλου, καταδεικνύοντας μείωση της φαινολικής οξειδωσης. Πράγματι, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ολικών διαλυτών, μη οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων στους κάλους, οι οποίοι επώαστηκαν σε μέσο περιέχον ασκορβικό οξύ, και γενικά η προσθήκη ασκορβικού οξέος ευνόησε την συσσώρευση των επιλεγμένων μικροδιατροφικών παραγόντων.

Η αρχική πτώση των συγκεντρώσεων Fe, Mn και Zn σε καλλιέργειες *in vitro*, έχει παρατηρηθεί και από τους Murphy et al. (1994) οι οποίοι έχουν αναφέρει μια αρχική πτώση των συγκεντρώσεων σε καλλιέργειες δελφινίου κατά τη διάρκεια καλλιέργειας 7 εβδομάδων, ακολουθούμενη από αύξηση προς το τέλος της περιόδου επώασης. Απέδωσαν αυτό το φαινόμενο στην «αραίωση» των περιεχομένων μεταλλικών αλάτων στις καλλιέργειες, οι οποίες, σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, αναπτύσσονταν ταχύτερα από το ρυθμό συσσώρευσης μεταλλικών αλάτων (ομοίως και για τα μακροστοιχεία). Διαπίστωσαν, επίσης, ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο ρυθμό αύξησης της καλλιέργειας και τις συγκεντρώσεις Fe και Zn. Οι Mezzetti και συν. (Mezzetti et al., 1991) ανέφεραν ότι έκφυτα προερχόμενα από βλαστούς *Actinidia deliciosa* συσσώρευσαν *in vitro* λιγότερο Fe, Cu, Mn και Zn σε σχέση με έκφυτα από φύλλα. Έτσι, μια μετατόπιση προς τα φύλλα ήταν προφανής, ειδικά κατά τον πρώτο μήνα. Ωστόσο, η συνολική συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων στον τυλώδη ιστό αυξήθηκε κατά την περίοδο καλλιέργειας.

Όπως και στην περίπτωση των μακροστοιχείων, από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι υπάρχει μια σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στη συσσώρευση μικροδιατροφικών παραγόντων, τη σύνθεση του καλλιεργητικού μέσου και την προέλευση του εκφύτου, η οποία θα μπορούσε να γίνει αντικείμενο πρακτικής εκμετάλλευσης για τη βελτίωση των υπαρχόντων καλλιεργητικών συνθέσεων και πρωτοκόλλων καλλιέργειας με σκοπό την ικανοποιητική ανάπτυξη κάλου χωρίς να

μειώνεται η ποσότητα παραγωγής, π.χ. καλλιεργώντας έκφυτα από βλαστούς σε μέσο εμπλουτισμένο με κινετίνη και ασκορβικό οξύ για τουλάχιστον 10 εβδομάδες.

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων έγινε επιτυχής απομόνωση πρωτοπλαστών τόσο από φύλλα ιξού όσο κι από κάλους ιξού, αποδεικνύοντας ότι το φυτό ανταποκρίνεται σε αυτή την τεχνική και μελλοντικά ο τρόπος αυτός μπορεί να οδηγήσει στην αναπαραγωγή φυτών με συγκεκριμένες ιδιότητες.

Τα αποτελέσματα, όσον αφορά τον αριθμό των βιώσιμων πρωτοπλαστών, είναι περίπου ίδια με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί γι' άλλα είδη, όπως είναι η *Brassica* (Schenck and Hoffmann, 1984) αλλά χαμηλότερα από αυτά στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) ή το κενάφ (*Hibiscus cannabinus*) ($2.4-2.5 \times 10^6$) (Firoozabady and DeBoer, 1986; Reichert and Liu, 1962). Παρ' όλα αυτά θα ήταν επαρκές για την επίτευξη αρχικής πυκνότητας «plating» για την εκκίνηση της καλλιέργειας πρωτοπλαστών, όπως προαναφέρθηκε για είδη όπως ο καπνός (*Nicotiana tabacum* - Takebe and Nagata, 1984) ή η πετούνια (*Petunia hybrida* - Binding and Krumbiegel-Schoeren, 1984). Αφού οι πρωτοπλάστες είναι ένα κατάλληλο υλικό για γενετική μετάλλαξη, θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό να επιτευχθεί ένα ικανοποιητικό πρωτόκολλο για πρωτοπλάστες στην αναπαραγωγή φυτών.

Η τελευταία πειραματική ενότητα αφορούσε τη διερεύνηση της *in vitro* τοξικότητας και επιμέρους επίδρασης σε βιοχημικά συστήματα των εκχυλισμάτων των κυτταροκαλλιεργειών του *V. album* σε φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι, ενώ υφίσταται πληθώρα μελετών των αποτελεσμάτων της εφαρμογής των λεκτινών και άλλων παραγώγων του ιξού *in vivo* (σε πειραματόζωα) και σε κλινικό επίπεδο (σε ανθρώπους), οι σχετικές αναφορές σε πειράματα *in vitro* είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Από την άποψη αυτή, η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να συνεισφέρει με πρωτότυπα αποτελέσματα.

Στα σχετικά πειράματα που έγιναν για τον έλεγχο της τοξικότητας των φυσιολογικών κυττάρων, φαίνεται καθαρά ότι το εκχύλισμα από το φυτό-δότη εμφανίζει τοξικότητα από τις μικρές ακόμη συγκεντρώσεις της κυτταρικής σειράς BFU-E, ενώ ο απλός κάλος εμφανίζει τοξικότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ο κάλος με την σωμακλωνική παραλλακτικότητα (SC) στις μικρές συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να παρουσιάζει τοξικότητα, αλλά στις μεγαλύτερες τείνει να γίνει τοξικός.

Η κυτταρική σειρά CFU-GM παρουσιάζεται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην επίδραση των πρωτεϊνών από τον ιξό είτε αυτές προέρχονται από το φυτό, είτε από τους κάλους, ιδιαίτερα στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Για τις μικρές συγκεντρώσεις (0,5 και 1 ng/ml) πρωτεϊνών που προέρχονται από το φυτό και τον κάλο δεν παρουσιάζεται τοξικότητα.

Στη φυσιολογική σειρά VERO, η τοξικότητα στα κύτταρα εμφανίζεται ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης κυρίως για την πρωτεΐνη που προέρχεται από το φυτό και τον σωμακλωνικό κάλο, ενώ για αυτήν που προέρχεται από τον κάλο είναι εμφανής για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 ng/ml.

Γενικά πάντως φαίνεται ότι το σημείο 10 ng/ml είναι οριακό – σημείο ορόσημο- στην επίδραση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ως προς την τοξικότητα σε όλες κυτταρικές σειρές και για όλες τις επεμβάσεις (από όπου κι αν προέρχεται η πρωτεΐνη). Κάποιες σειρές εμφανίζονται ιδιαίτερα ευαίσθητες στις επεμβάσεις (CFU-GM και VERO), ενώ η BFU-E για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (άνω των 10 ng/ml). Το εκχύλισμα από το φυτό εμφανίζεται πολύ τοξικό για όλες τις κυτταρικές σειρές ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις (π.χ. VERO), οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον απλό κάλο εμφανίζουν τοξικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω των 10 ng/ml, ενώ οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα εμφανίζουν τοξικότητα ανάλογα με το είδος των κυτταρικών

σειρών: στην κυτταρική σειρά VERO εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα ακόμη και στις μικρές συγκεντρώσεις (κάτω των 10 ng/ml), στην κυτταρική σειρά CFU-GM σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (πάνω από 10 ng/ml), ενώ στην κυτταρική σειρά BFU-E δεν φαίνεται να προκαλούν τοξικότητα.

Στα αποτελέσματα φαίνεται ότι το εκχύλισμα από το φυτό-δότη είναι πολύ τοξικό έως τοξικό σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, ακόμη και στις πολύ μικρές. Οι παραγόμενες, *in vitro*, πρωτεΐνες που προέρχονται από κάλο παρουσιάζουν τοξικότητα και στις δύο σειρές των κυττάρων, ενώ στις χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται ότι δεν είναι τοξικές και ιδιαίτερα αυτές οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τον κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Με βάση τα πειραματικά δεδομένα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η επιπλέον ουσία που περιέχεται στον κάλο με την σωμακλωνική παραλλακτικότητα, πολύ πιθανόν ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών που προάγουν την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος κι ευνοούν την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων, στα οποία εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, ενώ παράλληλα ασκούν και τοξική επίδραση στα μελετηθέντα καρκινικά κύτταρα. Σχετικά πρόσφατα, οι Lee et al. (2009) παρατήρησαν μία διέγερση του πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και κυττάρων NK (natural killers) τρωκτικών μετά την εφαρμογή λεκτινών του κορεατικού ιξού (*V. album* L. var. *coloratum*). Ωστόσο η ενίσχυση στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος δεν επαρκεί για την ερμηνεία των παρατηρηθέντων αποτελεσμάτων *in vitro* (αφού αυτά αφορούν καλλιέργειες και όχι οργανισμούς). Επιπλέον, οι Thies et al. (2005) έχουν ήδη αναφέρει ότι οι διαφορετικές λεκτίνες του ιξού μπορούν να έχουν άμεση κυτταροτοξικότητα *in vitro* χωρίς την παρουσία κυτοκινών ή παρεμπερών ουσιών. Σε σχετικά πειράματα με κύτταρα μελανώματος παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στις διαφορετικές λεκτίνες, η ML-I παρουσίαζε την ισχυρότερη αυτόνομη κυτταροτοξικότητα. Επίσης η επιλογή της κυτταρικής σειράς είναι σημαντική, επειδή έχει διαπιστωθεί η διαφορετική ικανότητα εξωκύτωσης των λεκτινών του ιξού *in vitro* (Schumacher et al., 1995), δηλαδή η διαφορετική ικανότητα ενός μηχανισμού εξουδετέρωσης της δράσης αυτών.

Όσον αφορά την προσθήκη εκχυλίσματος από το φυτό ιξού, φαίνεται ότι ενώ παρουσιάζει τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα PC12 στις μικρές συγκεντρώσεις από την πρώτη κιόλας ημέρα, αυτό δεν συνεχίζεται για τις επόμενες ημέρες επώασης, όπου φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη κυττάρων, κάτι που δεν συμβαίνει με την προσθήκη της μεγαλύτερης δόσης (10 ng/ml), η οποία φαίνεται ότι όσο περνούν οι μέρες επώασης τόσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που έχουν επιβιώσει (αύξηση της τοξικότητας).

Γενικά, οι διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των επεμβάσεων με 0,5 ng/ml και 1 ng/ml πρωτεΐνης δεν είναι στατιστικά σημαντικές παρά μόνο για την πρώτη ημέρα επώασης (για $p < 5\%$), ενώ είναι όσον αφορά την προσθήκη 10 ng/ml για την τρίτη ημέρα επώασης.

Η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα στην προσθήκη πρωτεϊνών από κάλους είναι πολύ μεγαλύτερη έναντι αυτών από το φυτό ιξού και φαίνεται από την πρώτη κιόλας ημέρα επώασης. Και στις τρεις συγκεντρώσεις προσθήκης πρωτεϊνών, η τοξικότητα αυξάνει όσο αυξάνει ο χρόνος επώασης, εκτός από την δεύτερη μέρα της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Αυτό που παρατηρείται και για τρεις συγκεντρώσεις είναι ότι κατά την τέταρτη ημέρα επώασης παρατηρείται αύξηση των κυττάρων και μείωση της τοξικότητας (κάτι που παρατηρείται και για τα φυσιολογικά κύτταρα σε κάποιες συγκεντρώσεις- κάλος στην κυτταρική σειρά VERO σε συγκεντρώσεις 0,5 ng/ml και 1 ng/ml, κάλος με SC στις κυτταρικές σειρές BFU-E, CFU-GM για τις 0,5 ng/ml και 1 ng/ml συγκεντρώσεις).

Η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα της σειράς PC12 είναι έντονη από την πρώτη κιάλας ημέρα επώασης και πιο έντονη την τρίτη ημέρα -στατιστικώς σημαντικές διαφορές- και για τις τρεις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Την τέταρτη ημέρα παρατηρείται ό,τι και στην επώαση με πρωτεΐνες από κάλο (ανάπτυξη κυττάρων).

Η τοξικότητα παρουσιάζεται μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση της προστιθέμενης πρωτεΐνης (αναλογική σχέση) και όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επώασης (συγκεντρώσεις 1 ng/ml και 10 ng/ml) έως τις τρεις πρώτες ημέρες .

Γενικά φαίνεται ότι για την επίτευξη μεγαλύτερης τοξικότητας ο χρόνος επώασης είναι σχετικός, αλλά δεν είναι απεριόριστος. Φαίνεται ότι από την τέταρτη ημέρα κι έπειτα ο χρόνος βοηθά την ανάπτυξη των κυττάρων κι όχι την καταστροφή τους. Ίσως μετά την πάροδο αυτού του χρόνου η δράση των κυτταροτοξικών πρωτεϊνών (βισκοτοξινών, λεκτινών) που περιέχονται στις προστιθέμενες ουσίες ατονούν και επικρατεί η δράση των ανοσορυθμιστικών πρωτεϊνών με θετικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη των κυττάρων (λεκτίνες), μόνο σε επίπεδο οργανισμού, οπότε και χρειάζεται επανάληψη της δόσης (και κατ' επέκταση επανάληψη της θεραπείας).

Γενικά, συγκρίνοντας τις μέρες η πρώτη με την τρίτη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μόνο για την συγκέντρωση 10 ng/l, ενώ η πρώτη με την τέταρτη δεν διαφέρουν που σημαίνει ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται φτάνοντας τα αρχικά επίπεδα της καλλιέργειας.

Στο εκχύλισμα πρωτεϊνών από κάλο αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί αφού το εκχύλισμα είναι γενικά πιο καθαρό από άλλες ουσίες και περιέχει πρωτεΐνες του ιξού με συγκεκριμένη δράση. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο για τον κάλο με SC τόσο στις κυτταρικές σειρές με φυσιολογικά κύτταρα, όσο και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η δράση του εκχυλίσματος αυτού μπορεί να αιτιολογηθεί με βάση την διαφορετική πρωτεΐνη που περιέχει, λόγω σωμακλωνικής παραλλακτικότητας, η οποία φαίνεται από τα πειράματα να προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων. Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι διαφορετικές ιδιότητες του εκχυλίσματος που προέρχεται από τον κανονικό κάλο, σε σχέση με το φυτό-δότη, μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική αναλογία των επιμέρους λεκτινών (MLI, MLII, MLIII). Επειδή όμως οι πρωτεΐνες αυτές έχουν παραπλήσιο μοριακό βάρος, δεν κατέστη δυνατός ο ηλεκτροφορετικός διαχωρισμός τους με τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη και, επομένως, η επαλήθευση της υπόθεσης αυτής (διαφορετική αναλογία *in vitro/in vivo*).

Η τοξικότητα για την καρκινική σειρά RAW είναι μεγαλύτερη κατά την δεύτερη ημέρα επώασης και για όλες τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και περισσότερο για την μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 ng/ml) από κάλο με σωμακλωνική παραλλακτικότητα, ενώ κατά την τέταρτη ημέρα παρατηρείται ανάπτυξη των κυττάρων, στατιστικώς σημαντική μόνο για την μεγαλύτερη συγκέντρωση προστιθέμενων πρωτεϊνών.

Στην προσπάθεια να ερευνηθεί και να μετρηθεί η παραγωγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα των καλλιεργούμενων κυτταρικών σειρών, ως συνέπεια της δράσης των προστιθέμενων πρωτεϊνών από το φυτό του ιξού και από τους κάλους του, διαπιστώθηκε ότι για την καρκινική σειρά PC12, στις χαμηλές συγκεντρώσεις όλων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων η παραγωγή ελευθέρων ριζών (E.P.) ήταν μικρότερη από αυτή του μάρτυρα, ενώ η χαμηλότερη τιμή (χαμηλότερη συσσώρευση E.P.) σημειώθηκε για την μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 ng/ml) πρωτεΐνης από το φυτό του ιξού.

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά των φυσιολογικών κυττάρων (VERO) φαίνεται ότι οι περισσότερες συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προκαλούν μεγαλύτερη

αύξηση της συσσώρευσης των E.P. από ότι παρατηρείται στον μάρτυρα, ενώ για την συγκέντρωση 10 ng/ml του φυτού ιξού παρατηρείται η μικρότερη τιμή.

Η μοναδική γνωστή αναφορά στην αλληλεπίδραση των λεκτινών του ιξού με τις ελεύθερες ρίζες αφορά την εφαρμογή πρωτεϊνών από το κορεατικό ιξό (*V. album* L. var. *coloratum*) στη φυσιολογική κυτταρική σειρά LLC-PK₁ (νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα), όπου παρατηρήθηκε αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα και μείωση της κυτταρικής απόπτωσης (Kim et al., 2010).

Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους οι οποίες μελετήθηκαν (περατότητα πλασμαλήμματος, μιτοχονδριακή λειτουργία), και όπως αναφέρθηκε στην ενότητα των αποτελεσμάτων, διαφαίνεται μία κατά κανόνα αρνητική επίδραση των πρωτεϊνικών κλασμάτων του ιξού (και κυρίως όσων έχουν παραχθεί από φυσιολογικούς κάλους) στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τουλάχιστον όσον αφορά την πιθανή πρόκληση αποπτωτικών φαινομένων στην καρκινική κυτταρική σειρά PC12. Αντίθετα, στη φυσιολογική σειρά VERO οι αρνητικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν μόνο μετά την εφαρμογή των πρωτεϊνών είτε του φυτού ή του σωμακλωνικά παραλλαγμένου κάλου.

Πρέπει να τονιστεί ότι είναι η πρώτη απόπειρα διεξοδικής αξιολόγησης της *in vitro* τοξικότητας των λεκτινών του ιξού με μελέτη της επίδρασης σε διάφορα κυτταρικά συστήματα. Επιπρόσθετα, οι κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν δεν έχουν υπάρξει προηγουμένως αντικείμενο μελέτης του συγκεκριμένου πεδίου έρευνας. Ωστόσο ανήκουν στις κατεξοχήν χρησιμοποιούμενες σαν μοντέλα στην αντικαρκινική έρευνα (Kintzios, 2006).

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης περιγράφουν την πρώτη ολοκληρωμένη προσέγγιση τόσο της ιστοκαλλιέργειας του *Viscum album* όσο και της δυνατότητας δημιουργίας κυτταρικών εργοστασίων για την παραγωγή λεκτινών και άλλων ουσιών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Παρότι τα παραχθέντα δεδομένα αποτελούν ουσιαστικά το υπόβαθρο για μελλοντική έρευνα σε βάθος, επιτρέπουν το «άνοιγμα» ενός παράθυρου αισιοδοξίας για την πιθανή βιοτεχνολογική αξιοποίηση του σημαντικού αυτού φυτικού είδους στην αντικαρκινική έρευνα και πρακτική. Ειδικότερα, η διαπίστωση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας και της συνεπακόλουθης παραγωγής πρωτεϊνών με αυξημένη επιλεκτική κυτταροτοξικότητα προσφέρουν ένα ελκυστικό πεδίο μελέτης. Ανάμεσα στα προτεινόμενα αντικείμενα έρευνας ανήκει η διαλεύκανση του βιοχημικού μονοπατιού βιοσύνθεσης της παραλλαγμένης πρωτεΐνης, με προοπτικές απομόνωσης του σχετικού γενετικού μηχανισμού. Επίσης θα πρέπει να συσχετισθούν τα αποτελέσματα των δοκιμών *in vitro* με αντίστοιχα *in vivo* (σε πειραματόζωα).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι πιθανόν η επόμενη «επανάσταση» στη φυτοχημική θεραπεία του καρκίνου να προέλθει από την κλινική εφαρμογή φυτικών εκχυλισμάτων με βασικά απροσδιόριστα συστατικά, παρά ενός πλήρως χαρακτηρισμένου μορίου. Δεν πρέπει να προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι σημαντική πρόοδος σε αυτή την κατεύθυνση έχει σημειωθεί με τη χρήση φυτών της παραδοσιακής, ολιστικής κινεζικής ιατρικής (Zhu et al., 2005; Kintzios et al., 2006). Αντίθετα, επιβεβαιώνει την ανάγκη αναθεώρησης του ισχύοντος δόγματος «ένα φάρμακο προς ένα στόχο». Ο ιξός θα μπορούσε να έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή, ιδιαίτερα υπό το πρίσμα της βιοτεχνολογικής του αξιοποίησης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson, W.J. and Beardall, J. (1991) Molecular activities of plant cells. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Bajaj, Y.P.S. (1995) Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 31.
- Barberaki, M., Kintzios, S. (2002) Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. *Scientia Horticulturae*, 95, pp133-150.
- Barney, C.W., Hawksworth, F.G. and Geils, B.W. (1998) Hosts of *Viscum album*. *Eur. J. For. Path.* 28, 187–208.
- Bearden, J.C. (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim. Biophysica Acta* 533, 525–529.
- Becker, H. (2000) European mistletoe: Taxonomy, Host trees, Parts used, Physiology. In: *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Approaches: Mistletoe The Genus Viscum*. (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers. Amsterdam, pp. 31-43.
- Becker, H. (1986) Botany of European mistletoe (*Viscum album* L.). *Oncology* 43(Suppl 1), 2-7.
- Becker, H. and Schwarz, G. (1971) Callus cultures from *Viscum album*. A possible source of raw materials for gaining therapeutic interesting extracts. *Planta Medica* 20(4), 357-62.
- Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Geisel, J., and Pulverer, G. (1993) Comparative studies on the immunoactive action of galactoside-specific mistletoe lectin. Pure substance compared to the standardized extract. *Arzneimittelforschung* Feb, 43(2), 166-9.
- Beuth, J. (2000) Natural versus recombinant mistletoe lectin-1. Market trends. In: *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Approaches: Mistletoe The genus Viscum*. (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers. Amsterdam, pp. 237-246.
- Binding, H. and Krumbiegel-Schroeren, G. (1984) Isolation and culture of protoplasts: *Petunia*. In: Vasil KI (ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, New York, USA, pp 340-347.
- Braedel-Ruoff, S. (2010) Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials. *Forsch Komplementmed* 17 (2), 63-73.
- Braeckman, B. P., Houthoofd, K., Nemie De Vreese, A., Vanfleteren, J.R. (2002) Assaying metabolic in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Aging Dev.* 123, 105-119.
- Burnell, J.N. (1988) The biochemistry of manganese in plants. In *Manganese in Soils and Plants* (Eds: R.D. Graham, R.J. Hannam and N.C.Uren) Kluwer Academic: Dordrecht, 125–137.

Büssing, A. (2000) Introduction: History of Mistletoe Uses. Biological and Pharmacological Properties of *Viscum album*. From Tissue flask to man. Overview on *Viscum album* L. Products. In: *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Approaches: Mistletoe The genus Viscum*. (Ed. A. Büssing) Harwood Academic Publishers. Amsterdam, pp. 1-6, 123-181, 209-221.

Büssing, A., Schaller, G. and Pfüller, U. (1998) Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Res.* 18, 4291–6.

Büssing, A., Regnery, A., and Schweizer, K. (1995) Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression. *Cancer Lett.* Aug 1, 94(2), 199- 205.

Büssing, A. and Schietzel, M. (1999) Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. Extracts from different host trees, correlate with their content of toxic Mistletoe lectins. *Anticancer Res.* 19, 23–28.

CA (Anonymous) (1983) Unproven methods of cancer management: Iscador. *CA: a Cancer J. Clinicians* 33, 186–8.

Cammarata, P.L. and Cajelli, E. (1967) Free amino acid content of *Viscum album* L. berries parasitizing the *Pinus silvestris* L. and *Pinus nigra* Arnold var. *austriaca*. *Boll. Chim. Farm.* Aug. 106(8), 521–6.

Chen, P.M., Hsiao, K.I., Su, J.L., Liu, J. and Yang, L.L. (1992) Study of the activities of Chinese herb *Viscum alniformosanae* Part II: The components of conditioned medium produced by *Viscum alniformosanae*-stimulated mononuclear cells. *Am. J. Chin. Med.* 20(3–4), 307–12.

Cragg, G.M. (1998) *Paclitaxel (Taxol)*: A success story with valuable lessons for Natural Product Drug discovery and development. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Cragg, G.M., Schepartz, S.A., Suffness, M., Grever, M.R. (1993) The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and Anti-HIV agents. *J. of Natural Products* 56(10), 1657-1668.

Dahleen, L.S. (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43, 267–269.

Danieli, B. (1998) Vinblastine-type antitumor alkaloids: a method for creating new C17 modified analogues. *The Journal of Organic Chemistry.* 63, 8586-8588.

Debergh, P., De Riek, J. and Matthys, D. (1994) Nutrient supply and growth of plants in culture. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (Eds: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J. Davies) Kluwer Academic: Dordrecht, 58–68.

- Drossopoulos, J.B., Bouranis, D.L., Kintzios, S., Aivalakis, G., Karides, J., Chorianopoulou, S.N., and Kitsaki, C. (1998) Effect of nitrogen fertilization on distribution profiles of selected macro-nutrients in oriental field-grown tobacco plants. *J. Plant Nutr.* 22(3), 527–541.
- Eisenbraun, J., Scheer, R., Kroz, M., Schad, F., Huber, R. (2011) Quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and concurrent therapy with a mistletoe extract. *Phytomedicine* 18, 151-157.
- Elstner, E.F. (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 73–96.
- Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Schinina, M.E. and Giartosio, A. (1990) Characterization of maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* 29, 2411–2414.
- Fienberg, A.A., Choi, J.H., Lubich, W.P. and Sung, Z.R. (1984) Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Planta* 162, 532.
- Fink, J.M. (1988) *Third Opinion: An International Directory to Alternative Therapy Centers for the Treatment and Prevention of Cancer and Other Degenerative Diseases*. Second edn. Garden City Park, New York: Avery Publishing Group Inc., p.137.
- Firoozabady, E. and DeBoer, D.L. (1986) Isolation, culture and cell division in cotyledon protoplasts of cotton (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*) *Plant Cell Reports* 5, 127-131.
- Franz, H. (1986) Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43(1), 23–34.
- Fukui M., Azuma J. and Okamura K. (1990) Induction of callus from mistletoe and interaction with its host cells. *Bulletin of the Kyoto University Forests* 62, 261-269.
- Garnier, F., Label, Ph., Hallard, D., Chenieux, J.C., Rideau, M., Hamdi, S. (1996) Transgenic periwinkle tissues overproducing cytokinins do not accumulate enhanced levels of indole alkaloids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 45, 223-230.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. and Thorpe, T.A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 32, 272–289.
- Grieve, M. (1994) *A Modern herbal*. Edited and introduced by Mrs. C.F. Leyel, Tiger books international, London, 547-548.
- Gomez, M.A, Saenz, M.T., Garcia, M.D., Ahumada, M.C. and De La Puerta, R. (1997) Cytostatic activity against Hep-2 cells of methanol extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. and two isolated principles. *Phytother. Res.* 11, 240–2.

- Gorter, R. (1994) The European Mistletoe (*Viscum album*): new studies show significant results for AIDS and immune system problems. Institute for Oncological and Immunological Research.
- Hames, B.D., and Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. IRL Press Limited. Oxford, England.
- Harvey A. Richard and Champe C. Pamela. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. J. B. Lippincott Company, 1992. Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρ. Παρισιάνο» Μαρία Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα, 1994.
- Hashimoto, T. and Y. Yamada. 1983. Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots of *Hyoscyamus niger*. *Planta Med.* 47, 195-199.
- Hauser, S. and Kast, A. (2001) Iscusin – preparations for pre- and postoperative treatment of malignant tumors. (BCCA Cancer Information Centre search file 701).
- Hauser, S.P. (1993) Unproven methods in cancer treatment. *Curr. Opinion Oncol.* 5, 646–54.
- Hausling, M., Romheld, V., and Marschner, H. (1985) Beziehungen zwischen Chlorosegrad, Eisengehalten und Blattwachstum von Weinreben auf verschiedenen Standorten. *Vitis* 24, 158–168.
- Heiny, B.M. and Benth, J. (1994) Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces B-endorphin release and immunopotentiality in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 14, 1339–42.
- Helfferrich, C. (1993) *Taxol* Revisited Article, Alaska Science Forum 1126.
- Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., Srinivasan, V., Shuler, M.L. (1996) *Taxol* production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44, 95-102.
- Holtorf, S., Ludwig-Muller, J., Apel, K. and Bohlmann, H. (1998) High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Molecular Biology* 36(5), 673-680.
- Janssen, O., Scheffler, A., Kabelitz, D. (1993) In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung* 43(11), 1221–7.
- Katapodis, P., Kavarnou, A., Kintzios, S., Pistola, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2002) Production of acidic xylooligosaccharides by a family 10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* and use as plant regulators. *Biotechnology Letters* 24: pp. 1413 – 1416.
- Ketchum, R.E.B, Tandom, M., Gibson, D.M., Begley, T. and M.L. Shuler. (1999) Isolation of labeled 9-dihydrobaccatin III and related taxoids from cell cultures of *Taxus canadensis* elicited with methyl jasmonate. *J. Nat. Prod.* 62, 1395-1398.

- Kienle, S.G., Kiene, H., (2011) Influence of *Viscum album* L (European Mistletoe) Extracts on Quality of life in Cancer Patients: a Systematic Review of Controlled Clinical Studies. *Integrative Cancer Therapies* 9 (2), 142-157.
- Kim, B.K., Choi, M.J., Par,k K.Y., Cho, E.J. (2010) Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1152-1158.
- Kintzios, S. (2006) Terrestrial plant species and compounds with anticancer properties. *Critical Reviews in Plant Science.* 25: 79-115.
- Kintzios, S. and Barberaki, M. (2000) The Biotechnology of *Viscum album* L.: tissue Culture, Somatic Embryogenesis and Protoplast Isolation. In: *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Approaches: Mistletoe The Genus Viscum* (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 95–99.
- Kintzios, S., Barberaki, M., Tourgielis, P., Aivalakis, G., Volioti, A. (2002) Preliminary evaluation of somaclonal variation for the in vitro production of new toxic proteins from *Viscum album* L. *J. Herbs Spices Medicinal Plants* 9 (2/3), 217-221.
- Kintzios, S., Barberaki, M., Drossopoulos, J., Turgelis, P., Konstas, J. (2003) Effect of medium composition and explant source on the distribution profile selected micronutrients in mistletoe tissue cultures. *Journal of Plant Nutrition* Vol. 26, No 2, pp 369-397.
- Kintzios, S., Barberaki, M. (2004) *Plants that fight Cancer*. CRC Press LLC: Boca Raton, U.S.A.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J.B. and Lymperopoulos, C. (2001) Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose (*Rosa hybrida*). *J. Plant Nutr.* 23, 1407–1419.
- Kovacs, E., Hajto, T. and Hostanska, K. (1991) Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador). *Eur. J. Cancer* 27(12), 1672–6.
- Kuttan, G., Menon, L.G., Antony, S. and Kuttan, R. (1997) Anticarcinogenic and antimetastatic activity of Iscador. *Anticancer Drugs* Apr. 8 (Suppl 1), S15–16.
- Langer, M., Zinke, H., Eck, J., Mockel, B., Lentzen, H. (1997) Cloning of the active principle of mistletoe: the contributions of mistletoe lectin single chains to biological functions. *European Journal of Cancer* 33, 24.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Laemmli, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685.

- Lee, C-H., Kim, J-K., Kim, H.Y., Park, S.M., Lee, S.M. (2009) Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo. *Intern. Immunopharmacol.* 9: 1555-1561.
- Leifert, C., Kenneth, P.M. and Lumsden, P.J. (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Rev. Plant Sci.* 14 (2), 83–109.
- Lorch, E. and Troger, W. (2000) Pharmaceutical quality of mistletoe preparations. In: *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Approaches: Mistletoe The Genus Viscum* (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 223–236.
- Lovatt, C.J. (1985) Evolution of xylem resulted in a requirement for boron in the apical meristems of vascular plants. *New Phytol.* 99, 509–522.
- Lukyanova, M., Chernyshov, P., Omelchenko, I., Slukvin, I., Pochinok, V., Antipkin, G., Voichenko, V., Heusser, P. and Schneiderman, G. (1992) Research on immune-suppressed children following the Chernobyl accident. Mistletoe effective for Chernobyl children. Ukrainian Institute for Pediatrics, Lukas Klinik, Switzerland.
- Luther, P., Franz, H., Haustein, B. and Bergmann, K.C. (1977) Isolation and characterization of mistletoe extracts (*Viscum album* L.). II. Effect of agglutinating and cytotoxic fractions on mouse ascites tumor cells. *Acta Biol Med Ger* 36(1), 119–25.
- Matthes, H., Friedel, W.E., Bock, P.R., Zanker K.S. (2010) Molecular mistletoe therapy: friend or foe in established anti-tumor protocols? A multicenter, controlled, retrospective pharmaco-epidemiological study in Pancreas cancer. *Current Molecular Medicine* 10, 430-439.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Ed.; Academic Press: New York.
- Metzner, G., Franz, H., Kindt, A., Schumann, I. and Fahlbusch, B. (1987) Effects of lectin I from mistletoe (ML I) and its isolated A and B chains on human mononuclear cells: mitogenic activity and lymphokine release. *Pharmazie* May 42(5), 337–40.
- Meyer, A., Rypniewski, W., Celewicz, L., Erdmann, V.A., Voelter, W., Singh, T.P., Genov, N., Barciszewski, J., Betzel, Ch. (2007) The mistletoe lectin I – Phloretamide structure reveals a new function of plant lectins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 195-200.
- Mezzetti, B., Rosati, P. and Casalicchio, G. (1991) *Actinidia deliciosa* C.F. Liang in vitro. I. Growth and mineral uptake by explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25, 91–98..
- Mockel, B., Schwarz, T., Eck, J., Langer, M., Zinke, H., and Lentzen, H. (1997) Apoptosis and cytokine release are biological responses mediated by recombinant mistletoe lectin in vitro. *European Journal of Cancer* 33, 35.

Montague, M.J., Koppenbring, J.W. and Jaworski, E.G. (1978) Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* 62, 430.

Mueller, A.E. and Anderer, A.F. (1990) A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon _ inducer. *Cancer Immunol Immunother.* 32, 221–7.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 472-497.

Murphy, K.P., Nicholas, J.R., Leifert, C. and Lumdsen, P.J. (1994) Growth and mineral nutrition in micropropagated delphinium during a subculture period. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (Eds: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, and W.J. Davies) Kluwer Academic: Dordrecht, 72–76.

Νικολάου Κ. Κυριάκος, Montagnon Tamsyn, Βασιλικογιαννάκης Ε. Γεώργιος Τα φυσικά προϊόντα και η συνθετική χημεία στην εμπροσθοφυλακή της αντικαρκινικής έρευνας. *BIO - Περιοδικό για την Βιοτεχνολογία, το Περιβάλλον και τον Άνθρωπο*. Τεύχος Νο 5, Απρίλιος – Ιούνιος 2003.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 359-363.

Oksman-Caldentey, K.-M. (1998) Somaclonal variation in Solanaceous medicinal plants. In S. Mohan Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia, eds. *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Kluwer, Dordrecht. pp. 233-254.

Oksman-Caldentey, K.-M., Vuorela, H., Strauss, A. and Hiltunen, R. (1987) Variation in the tropane alkaloid content of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Med.* 52, 6-12.

Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1982) Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album L. (Mistletoe)*. *J. Biol. Chem.* 257(22), 13263–70.

Olaku, O., White, J.D. (2011) Herbal therapy use by cancer patients: A literature review on case reports. *European Journal of Cancer* 47, 508-514.

Ostermann, Th., Raak, Chr., Bussing, A. (2009) Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador) : a systematic literature review. *BMC Cancer* 9, 451.

Ontario Breast Cancer Information Exchange Project (1994) Guide to unconventional cancer therapies. First edn. Ontario Breast Cancer Information Exchange Project, Toronto. 76–79.

Pfuller, U. (2000) Chemical constituents of European mistletoe (*Viscum album L.*) In: *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Approaches: Mistletoe The Genus Viscum* (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 101–22.

- Pryce, S., Lumdsen, P.J., Berger, F., Nicholas, J.R. and Leifert, C. (1994) The effect of plant density and macronutrient nutrition on *Iris* shoot cultures. P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, and W.J. Davies (eds.). *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer, Dordrecht, 69-71.
- Ramm, H., Urech, K., Scheiber, M. and Grazi, G. (2000) Cultivation and development of *Viscum album* L. In: *Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Approaches: The Genus Viscum* (Ed. A. Bussing) Harwood Publishers, Amsterdam, pp. 75–94.
- Reichert, N.A. and Liu, N. (1962) Protoplast isolation, culture and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44, 201-210.
- Reinbott, T.M. and Blevins, T.G. (1995) Response of soyabean to foliar-applied boron and magnesium and soil-applied boron. *J. Plant Nutr.* 18, 179–200.
- Reinert, J. and Yeoman, M. (1982) *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer-Verlag, Berlin.
- Rentea, R., Lyon, E. and Hunter, R. (1981) Biologic properties of iscador: a *Viscum album* preparation I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. *Lab. Invest.* Jan. 44(1), 43–8.
- Ritter, P.R., Tischoff, I., Uhl, W., Schmidt, E., Meier, J.J. (2010) Sustained partial remission of metastatic pancreatic cancer following systemic chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin plus adjunctive treatment with mistletoe extract. *Onkologie* 33 (11), 617-619.
- Rowinsky, E.K., Cazenave, L.A. and Donehower, R.C. (1990) *Taxol*: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. *Review. J. of the National Cancer Institute* 82, (15), August 1, 1247-1259.
- Samuelsson, G. (1992) *Drugs of Natural Origin – A textbook of Pharmacognosy*. Third revised, enlarged and translated edition. Swedish Pharmaceutical Press, pp. 302-427.
- Samuelsson, G. (1996) Φαρμακευτικά Προϊόντα Φυσικής Προελεύσεως – Εγχειρίδιον Φαρμακογνωσίας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 291-418.
- Scientific American staff. Fact sheet: Twelve Major Cancers. *Scientific American*, September, 1996.
- Schenck, H.R. and Hoffmann, F. (1984) Isolation and culture of protoplasts: *Brassica*. In: Vasil KI (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, New York, USA, pp 356-368.
- Schink, M., Moser, D. and Mechelke, F. (1992) Two-dimensional isolectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (mistletoe). *Naturwissenschaften* Feb. 79(2), 80–1.

Schumacher, U., Adam, E., Brooks, S.A., Leathem, A.J. (1995) Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular references to *Helix pomatia* agglutinin. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 275-281.

Smith, B.A., Reider, M.L., and Fletcher, J.S. (1982) Relationship between vital staining and subculture growth during the senescence of plant tissue culture. *Plant Physiol.* 70, 1228-1230.

Stein, M.G., Edlund, U., Pfuller, U., Bussing, A. and Schietzel, M. (1999) Influence of polysaccharides from *Viscum album* L. on human lymphocytes, monocytes and granulocytes in vitro. *Anticancer Res.* 19, 3907–14.

Stein, G.M., Schietzel, M., and Büssing, A. (1998) Mistletoe in immunology and the clinic. *Anticancer Res.*, 18, 3247–3257.

Sweeney, E.C., Tonevitsky, A.G., Palmer, R.A., Niwa, H., Pfueller, U., Eck, J., Lentzen, H., Agapov, I.I. and Kirpichnikov, M.P. (1998) Mistletoe lectin I forms a double trefoil structure. *FEBS Lett.* 431(3), 367–70.

Swiss Society for Oncology. Iscador. (2001) (BCCA Cancer Information Center search file 701).

Swiss Society for Oncology, Swiss Cancer League, Study Group on Unproven Methods in Oncology. Helixor-mistletoe preparations for treatment of cancer. Document UICC UMS010. (BCCA Cancer Information Centre search file 701).

Takebe, I. and Nagata, T. (1984) Isolation and culture of protoplasts: *Tobacco*. In: Vasil KI (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, New York, USA, pp 328-337.

Thies, A., Nugel, D., Pfüller, U., Moll, I., Schumacher, U. (2005) Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicol.* 207: 105-116.

Torres, K.C. (1989) *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. New York, Chapman & Hall, pp. 26-51.

U.S. Congress, Office of Technology Assessment (1990) *Unconventional cancer treatments*. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office. Sept. pp. 81–86.

Vester, F. (1977) Über die kanzerostatischen und immunogenen Eigenschaften von Mistelproteinen. *Krebsgeschehen* 9, 106-114.

Wagner, H., Jordan, E. and Feil, B. (1986) Studies on the standardization of mistletoe preparations. *Oncology* 43(1), 16–22.

Warker, M., John (1994) Identification of glycoproteins on Nitro cellulose Membranes and Gels. *Method in molecular biology Basic protein and peptide protocols*. Human press, Totowa New Jersey. Ch. 16 pp. 113 – 118.

Werner, M., Zanker, K.S. and Nikolai, G. (1998) Stimulation of T-cell locomotion in an in vitro assay by various *Viscum album* L. preparations (Iscador). *Int. J. Immunotherapy* XIV(3), 135–42.

White, P.R. (1943) A handbook of plant tissue culture. The Jacques Cattal Press, Tempe, AZ.

Widholm, J.M. (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47, 189-194.

Williams, R.R. (1992) Towards a model of mineral nutrition in vitro. In: *Transplant Production Systems* (Eds: K. Kurata and T. Kozai) Kluwer Academic: Dordrecht, 213–219.

Wilson, B.R. (1985). *Cancer Quackery Primer*. Dallas, Oregon.

Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Baek, Y.J., Huh, C.S., Song, S.K., Lee, K.H., Azuma, I. and Kim, J.B. (1998) Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int. J. Immunopharmacol* 20(4–5), 163–72.

Zenk, M.H. 1978. The impact of plant cell culture on industry. In T.A. Thorpe, ed. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgary: Association of Plant Tissue Culture. Pp. 1-13.

Zhu, K., Fukasawa, I., Furuno, M., Inaba, F., Yamazaki, T., Kamemori, T., Kousaka, N., Ota, Y., Hayashi, M., Maehama, T., Inaba, N. (2005) Inhibitory effects of herbal drugs on the growth of human ovarian cancer cell lines through the induction of apoptosis. *Gynecol Oncol.* 97(2):405-9.

Ziska, P., Franz, H. and Kindt, A. (1978) The lectin from *viscum album* L. purification by biospecific affinity chromatography. *Experientia*, 34(1), 123–4.

Useful addresses:

Verein fuer Krebsforschung, 01141617012323.

Prof. Dr Robert Gorter,

Institute for Oncological and Immunological Research,

011493039763420 (Fax: 3422).

NOVIPHARM

A-9210 Portschach Klagenfurter Str 164, Austria.

Tel.: 04272-2751-0, Fax: 04272-3119

Terrestrial plant species with anticancer activity 61

World Web site:

<http://www.npwrc.usgs.gov>

<http://uvalde.tamu.edu>

<http://www.uog.edu>

<http://stuartxchange.com>

<http://www.tropilab.com>
<http://www.alohatropicals.com>
<http://lamington.nrsm.uq.edu.au>
<http://www.hort.purdue.edu>
<http://www.floridata.com>
<http://django.harvard.edu>
<http://www.bali-travelnews.com>
<http://www.streetside.com>
<http://scisun.nybg.org>
<http://www.desert-tropicals.com>
<http://www.hortpix.com>
<http://www.chemfinder.com>
<http://biotech.icmb.utexas.edu/botany>
<http://www.vedamsbooks.com/no13147.htm>
<http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/ingles/projects.html>
<http://www.sare.org/htdocs/hypermail/html-home/3-html/0469.html>
<http://ericir.syr.edu/plweb-cgi/fastweb?getdoc+ericdb+972182+11+wAAA+Botany>
<http://www.pubmed>
<http://www.gi.alaska.edu/ScienceForum/ASF11/1126.html>
<http://.epnws1.ncifcrf.gov.2345/dis3d/dtp.html>
<http://www.floridata.com>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.reocities.com>
<http://www.sciencedirect.com>
<http://www.elsevier.de/phymed>
<http://www.ejconline.com>
<http://www.elsevier.com>
<http://ict.sagepub.com>

7. ΠΙΝΑΚΕΣ

ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΙΞΟΥ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΟΥΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥΣ

Ανταπόκριση των εκφύτων στην απολύμανση

Πίνακας 13. Ανταπόκριση των εκφύτων (Φύλλα, βλαστοί) στην απολύμανση

		Ανταπόκριση των εκφύτων στην απολύμανση					
		% Καλογένεση					
Είδος Εκφύτου	ΦΥΛΛΑ			ΒΛΑΣΤΟΙ			
Είδος Υποστρώματος	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	
NAA 1 mg/lt	8,3	8,3	1,7	8,3	8,3	1,25	
KIN 1 mg/lt	4,2	4,2	1,25	4,1	4,1	1,25	
2,4-D 2 mg/lt	4,2	4,2	0	4,2	4,2	0	
NAA: KIN 1 mg/lt	2,7	12,5	0	16,6	0	0	
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	0	0	0	0	0	0	
NAA 1 mg/lt+10%ασκορβικό οξύ	22,5	12,5	3,3	37,5	12,5	1,2	

KIN 1 mg/lt	18,8	7,5	1,3	13,6	6,25	5,3
2,4-D 2 mg/lt	13,6	0	0	45,5	0	0
NAA: KIN 1 mg/lt	20	6,25	3,3	24	5	6,3
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	20	0	0	20	0	0

Πίνακας 13A1: Ανάλυση συσχετίσεων επεμβάσεων απολύμανσης εκφύτου ιξού φύλλων ($\alpha=0,05$)

	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	1		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	0,140949	1	
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	0,586095	0,5363	1

Πίνακας 13B1: Ανάλυση συσχετίσεων επεμβάσεων απολύμανσης εκφύτου ιξού βλαστών ($\alpha=0,05$)

	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	1		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	0,133802	1	
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% +	0,057169	0,376356	1

0,01% HgCl ₂ (20-25 min)			
-------------------------------------	--	--	--

Πίνακας 13A2: Ανάλυση στατιστικών παραγόντων κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επεμβάσεων απολύμανσης σε έκφυτα ιξού φύλλων

Ανάλυση της Διακύμανσης (Anova: Single Factor)						
ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Είδος επέμβασης</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	114,3	11,43	72,18456		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	55,45	5,545	22,72358		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	10	10,85	1,085	1,794472		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	538,4795	2	269,23975	8,352611	0,0015	3,354131
Υπόλοιπο	870,3235	27	32,2342037			
Σύνολο	1408,803	29				

Πίνακας 13B2: Ανάλυση στατιστικών παραγόντων κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επεμβάσεων απολύμανσης σε έκφυτα ιζού βλαστών

Ανάλυση της Διακύμανσης (Ανοva: Single Factor)						
ΣΥΝΟΨΗ						
<i>Είδος επέμβασης</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	173,8	17,38	221,7462		
10% CaCl ₂ (10 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (12 min)	10	40,35	4,035	17,87114		
10% CaCl ₂ (15 min) + Tween 2% + 0,01% HgCl ₂ (20-25 min)	10	15,3	1,53	5,437333		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	1451,955	2	725,9775833	8,887537	0,001082	3,354131
Υπόλοιπο	2205,492	27	81,68489815			
Σύνολο	3657,447	29				

Εμφυτεύσεις-Περίοδος ανάπτυξης φυτού

Πίνακας 14. Χειμερινή Περίοδος ανάπτυξης φυτού

ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ		
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση	
	Φύλλα	Βλαστοί
NAA 1 mg/lt	27,3	8,3
KIN 1 mg/lt	4,2	4,2
2,4-D 2 mg/lt	4,2	4,2
BA 1 mg/lt	0	0
NAA: KIN 1 mg/lt	2,7	16,6
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	0	0

Πίνακας 15. Χειμερινή Περίοδος ανάπτυξης φυτού: υποστρώματα με Ασκορβικό οξύ

ΧΕΙΜΕΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ		
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση	
	Φύλλα	Βλαστοί
10% Ασκορβικό οξύ		
NAA 1 mg/lt	22,5	37,5
KIN 1 mg/lt	18,8	13,6
2,4-D 2 mg/lt	13,6	45,5
BA 1 mg/lt	25	0
NAA: KIN 1 mg/lt	20	24
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	20	20

Πίνακας 15B. Συσχέτιση της περιόδου ανάπτυξης του ιξού σε σχέση με την καλλιέργεια εκφύτων (φύλλων και βλαστών) του ιξού σε διάφορα υποστρώματα

	<i>Φύλλα</i>	<i>Βλαστοί</i>	<i>Φύλλα(A.O.)</i>	<i>Βλαστοί (A.O.)</i>
Φύλλα	1			
Βλαστοί	0,287855	1		
Φύλλα (A.O.)	0,185024	-0,0886	1	
Βλαστοί (A.O.)	0,512127	0,347039	-0,672331	1

Πίνακας 16. Καλοκαιρινή Περίοδος ανάπτυξης φυτού

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ		
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση	
	Φύλλα	Βλαστοί

NAA 1 mg/lt	0	0
KIN 1 mg/lt	0	0
2,4-D 2 mg/lt	0	0
BA 1 mg/lt	0	0
NAA: KIN 1 mg/lt	0	0
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	0	0

Πίνακας 17. Καλοκαιρινή Περίοδος ανάπτυξης φυτού: υποστρώματα με Ασκορβικό οξύ

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ		
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση	
	Φύλλα	Βλαστοί
10% Ασκορβικό οξύ		
NAA 1 mg/lt	0	0
KIN 1 mg/lt	0	0
2,4-D 2 mg/lt	0	0
BA 1 mg/lt	0	0
NAA: KIN 1 mg/lt	0	0
KIN: 2,4-D 1:2 mg/lt	0	0

ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Υποστρώματα με αυξίνες

Πίνακας 18. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού κατά την χειμερινή περίοδο με την προσθήκη αυξινών και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Χειμερινή Περίοδος				
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση			
	Φύλλα	Βλαστοί		
NAA 0,5 mg/lt	0	0		
NAA 1 mg/lt	8,3	8,3		
NAA 2 mg/lt	0	0		
NAA 5 mg/lt	0	0		
2,4-D 2 mg/lt	4,2	4,2		
	Φύλλα		Βλαστοί	
Είδος Υποστρώματος	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)
NAA 0,5 mg/lt	-	-	-	-
NAA 1 mg/lt	1,05	0,12	0,16	0,03
NAA 2 mg/lt				
NAA 5 mg/lt				
2,4-D 2 mg/lt				

Πίνακας 18B. Συσχέτιση των διαφόρων υποστρωμάτων αυξινών στην καλλιέργεια εκφύτων (φύλλων και βλαστών) του ιξού.

	NAA 0,5 mg/lt	NAA 1 mg/lt	NAA 2 mg/lt	NAA 5 mg/lt	2,4-D 2 mg/lt
NAA 0,5 mg/lt	1				
NAA 1 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	1			
NAA 2 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1		
NAA 5 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1	
2,4-D 2 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1

Υποστρώματα με κυτοκίνες

Πίνακας 19. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού κατά την χειμερινή περίοδο με την προσθήκη κυτοκινινών και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Χειμερινή Περίοδος				
Είδος Υποστρώματος	% Καλογένεση			
	Φύλλα		Βλαστοί	
KIN 0,5 mg/lt	0		0	
KIN 1 mg/lt	4,2		4,2	
KIN 2 mg/lt	0		0	
KIN 5 mg/lt	0		0	
BA 1 mg/lt	0		0	
Είδος Υποστρώματος	Φύλλα		Βλαστοί	
	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)
KIN 0,5 mg/lt	-	-	-	-
KIN 1 mg/lt	1,02	0,08	0,28	0,04
KIN 2 mg/lt				
KIN 5 mg/lt				
BA 1 mg/lt				

Πίνακας 19B. Συσχέτιση των διαφόρων υποστρωμάτων κυτοκινινών στην καλλιέργεια εκφύτων (φύλλων και βλαστών) του ιξού.

	KIN 0,5 mg/lt	KIN 1 mg/lt	KIN 2 mg/lt	KIN 5 mg/lt	BA 1 mg/lt
KIN 0,5 mg/lt	1				
KIN 1 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	1			
KIN 2 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1		
KIN 5 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1	
BA 1 mg/lt	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1

Συνδυασμοί Υποστρώματων

Πίνακας 20. Ανάπτυξη εκφύτων ιζού σε συνδυασμούς υποστρώματων διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Είδος Υποστρώματος				
	% Καλογένεση			
	Φύλλα		Βλαστοί	
NAA:KIN 1:0,5 mg/lt	1,8		12,5	
NAA:KIN 1:1 mg/lt	2,7		16,6	
NAA:KIN 1:2 mg/lt	0		8,3	
NAA:KIN 1:5 mg/lt	1		2,1	
NAA:KIN 1:10 mg/lt	1		9,6	
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	0		0	
NAA:BA 1:0,5 mg/lt	8		8	
NAA: BA 1:1 mg/lt	9		3	
NAA: BA 1:2 mg/lt	8		7	
NAA: BA 1:5 mg/lt	1		3	
NAA: BA 1:10 mg/lt	8		7	
Είδος Υποστρώματος	Φύλλα		Βλαστοί	
	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)
NAA:KIN 1:0,5 mg/lt				
NAA:KIN 1:1 mg/lt	1,14	0,15	0,76	0,024
NAA:KIN 1:2 mg/lt	0,28	0,056	0,18	0,05
NAA:KIN 1:5 mg/lt	0,2	0,038	0,7	0,1
NAA:KIN 1:10 mg/lt	0,18	0,042	0,52	0,08
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	-	-	-	-
NAA:BA 1:0,5 mg/lt	0,5	0,06	0,6	0,08
NAA: BA 1:1 mg/lt	1,44	0,2	1,51	0,04
NAA: BA 1:2 mg/lt	0,75	0,02	0,6	0,02
NAA: BA 1:5 mg/lt	1,95	0,16	1	0,05
NAA: BA 1:10 mg/lt	1,2	0,16	1,35	0,04

Υποστρώματα με Ασκορβικό οξύ

Πίνακας 21. Ανάπτυξη εκφύτων ιζού σε συνδυασμούς υποστρώματων διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης με την προσθήκη Ασκορβικού οξέος και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Είδος Υποστρώματος		
	% Καλογένεση	
	Φύλλα	Βλαστοί
10% Ασκορβικό οξύ		
NAA 1 mg/lt	22,5	37,5

KIN 1 mg/lt	18,8	13,6		
2,4-D 2 mg/lt	13,6	45,45		
NAA:KIN 1:1 mg/lt	20	24		
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	20	20		
20% Ασκορβικό οξύ				
NAA 1 mg/lt	3,8 (14)	3,8 (30)		
KIN 1 mg/lt	0	0		
2,4-D 2 mg/lt	0	0		
NAA:KIN 1:1 mg/lt	0	0		
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	0	0		
	Φύλλα		Βλαστοί	
Είδος Υποστρώματος	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)
10% Ασκορβικό οξύ				
NAA 1 mg/lt	1,18	0,13	0,28	0,04
KIN 1 mg/lt	1,78	0,17	0,99	0,15
2,4-D 2 mg/lt	0,85	0,1	0,7	0,06
NAA:KIN 1:1 mg/lt	1,56	0,33	0,88	0,24
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	0,83	0,14	1,63	0,22
20% Ασκορβικό οξύ				
NAA 1 mg/lt	0,7	0,16	0,58	0,12
KIN 1 mg/lt	-	-	-	-
2,4-D 2 mg/lt	-	-	-	-
NAA:KIN 1:1 mg/lt	-	-	-	-
2,4-D:KIN 2:1 mg/lt	-	-	-	-

Πίνακας 21Α. Συσχέτιση υποστρωμάτων και επεμβάσεων με ασκορβικό οξύ ανάλογα με το είδος του εκφύτου (φύλλα, βλαστοί)

	Φύλλα	Φύλλα με 10% Ασκορβικό οξύ	Φύλλα με 20% Ασκορβικό οξύ	Βλαστοί	Βλαστοί με 10% Ασκορβικό οξύ	Βλαστοί με 20% Ασκορβικό οξύ
NAA 1 mg/lt	0,21733982	1				
KIN 1 mg/lt	0,821476199	0,597052849	1			
2,4-D 2 mg/lt	0,26170568	0,275176403	0,145894	1		

NAA:KIN 1:1 mg/l	0,501103172	-0,407151675	0,401987	0,065799	1	
2,4-D:KIN 2:1 mg/l	0,821476199	0,597052849	1	0,145894	0,401987	1

Υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων

Πίνακας 22. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων

ΤΥΠΟΙ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		% Καλογένεση ΦΥΛΛΑ	% Καλογένεση ΒΛΑΣΤΟΙ
1.	MS + NAA	8,3	8,3
2.	MS + NAA + Ασκορβικό οξύ	22,5	37,5
3.	MS + ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ (1ml/l)	5,4	6,1
4.	MS + ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ (10 ml/l)	0	0
5.	MS + ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ (50 ml/l)	0	0
6.	MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡΙΝΩΝ (1 ml/l)	0	0
7.	MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ (10 ml/l)	0	0
8.	MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ (50 ml/l)	0	0
9.	MS + ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ (1 ml/l)	4,1	5,3
10.	MS + ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ (10 ml/l)	1,9	2,5
11.	MS + CH ₃ COONa (0.1 g/l)	3,8	4,6
12.	MS + CH ₃ COONa (0.2 g/l)	3,3	4,1
13.	MS + CH ₃ COONa (1.0 g/l)	0	0

Πίνακας 23Α. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων – μέτρηση του Νωπού Βάρους κατά την τέταρτη εβδομάδα

ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ (σε g) κατά την τέταρτη εβδομάδα			
		ΦΥΛΛΑ	ΒΛΑΣΤΟΙ
ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		N.B. (g)	N.B. (g)
MS +NAA		1.05	0.16

MS +NAA +Ασκορβικό οξύ		0.28	0.28
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 1ml/lt		0.84	0.13
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 10ml/lt		0	0
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 50ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 1ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 10ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 50ml/lt		0	0
MS +ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ 1ml/lt		0.85	0.45
MS +ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ 10ml/lt		0.51	0.165
MS +CH ₃ COONa 0.1mg/lt		0.48	0.281
MS + CH ₃ COONa 0.2mg/lt		0.45	0.15
MS + CH ₃ COONa 1mg/lt		0	0

Πίνακας 23B. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε υποστρώματα με την προσθήκη εκχυλισμάτων – μέτρηση του Ξηρού Βάρους κατά την τέταρτη εβδομάδα

ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ (σε g) κατά την τέταρτη εβδομάδα			
		ΒΛΑΣΤΟΙ	ΦΥΛΛΑ
ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		Ξ.Β. (g)	Ξ.Β. (g)
MS +NAA		0.03	0.12
MS +NAA +Ασκορβικό οξύ		0.04	0.13
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 1ml/lt		0.024	0.026
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 10ml/lt		0	0
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 50ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 1ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 10ml/lt		0	0
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡ 50ml/lt		0	0
MS +ΔΙΗΘ		0.06	0.097

ΛΙΓΝΙΝΩΝ 1ml/l			
MS +ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ 10ml/l		0.027	0.062
MS +CH ₃ COONa 0.1mg/l		0.047	0.073
MS + CH ₃ COONa 0.2mg/l		0.041	0.068
MS + CH ₃ COONa 1mg/l		0	0

Πίνακας 24Α. Επαγωγή καλογένεσης από έκφυτα ιξού σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού)

ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗ %
Μάρτυρας	16
Μάρτυρας + Ασκορβικό Οξύ	45
MS +Alt-4 0.3mg/l	13.33
MS +Alt-4 1.5mg/l	20
MS +Alt-4 3mg/l	20
MS +ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ ΕΛΑΤΟΥ 1ml/l	13.33

Πίνακας 24Β. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε απόκριση σε Alt-4 προερχόμενου από μικροβιακή επεξεργασία ολιγοσακχαριτών του κενάφ καθώς και κλασμάτων εκχύλισης ελάτου (φυσικού ξενιστή του ιξού) – μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	N.B. (g)	Ξ.B. (g)
MS +Alt-4 0.3 mg/l	0.3639	0.066
MS +Alt-4 1.5mg/l	0.2911	0.0571
MS +Alt-4 3mg/l	0.203	0.0530
MS + ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ ΕΛΑΤΟΥ 1ml/l	0.2876	0.0417
MS +Alt-4 1.66 mg/l	0.1023	0.1023
MS +Alt-4 16.6 mg/l	0.0863	0.0863
MS +ΔΙΗΘΗΜΑ ΗΜΙΚΥΤΤ 50ml/l	0.0634	0.0634
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡΙΝΩΝ 1ml/l	0.0828	0.0828
MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡΙΝΩΝ 10ml/l	0.1234	0.1234

MS + ΔΙΗΘ ΚΥΤΤΑΡΙΝΩΝ 50ml/lit	0.0702	0.0702
MS +ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ 1ml/lit	0.0766	0.0766
MS +ΔΙΗΘ ΛΙΓΝΙΝΩΝ 10ml/lit	0.0462	0.0462

Πίνακας 27. Ανάλυση Νοπού Βάρους κάλων ιξού από έκφυτα βλαστών και φύλλων σε υποστρώματα με την προσθήκη διαφόρων εκχυλισμάτων (ημικυτταρινών, κυτταρινών, λιγνινών και CH₃COONA).

<i>N.B. ΒΛΑΣΤΟΙ</i>		<i>N.B. ΦΥΛΛΑ</i>	
Μέσος	0,124308	Μέσος	0,343076923
Τυπικό σφάλμα	0,040128	Τυπικό σφάλμα	0,106574788
Διάμεσος	0,13	Διάμεσος	0,28
Διάμεσος τρόπος	0	Διάμεσος τρόπος	0
Τυπική απόκλιση	0,144685	Τυπική απόκλιση	0,384260862
Διακύμανση Δείγματος	0,020934	Διακύμανση Δείγματος	0,14765641
Κύρτωση	0,439793	Κύρτωση	-1,010974309
Ασυμμετρία	1,000654	Ασυμμετρία	0,645971653
Εύρος	0,45	Εύρος	1,05
Ελάχιστο	0	Ελάχιστο	0
Μέγιστο	0,45	Μέγιστο	1,05
Άθροισμα	1,616	Άθροισμα	4,46
Καταμέτρηση	13	Καταμέτρηση	13
Μεγαλύτερο(1)	0,45	Μεγαλύτερο(1)	1,05
Μικρότερο(1)	0	Μικρότερο(1)	0
Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	0,087432	Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	0,232206511

Πίνακας 29. Ανάλυση της % Επαγωγής κάλου, σε σχέση με την ανάπτυξη κάλου τόσο με το Νωπό όσο και με το Ξηρό Βάρος κάλων ιξού από έκφυτα βλαστών και φύλλων σε υποστρώματα με την προσθήκη διαφόρων εκχυλισμάτων (ημικυτταρινών, κυτταρινών, λιγνινών και CH₃COONA).

	Επαγωγή κάλου (%)		Ανάπτυξη κάλου (Νωπό Βάρος)		Ανάπτυξη κάλου (Ξηρό Βάρος)
Μέσος	8,0695	Μέσος	0,17451	Μέσος	0,030725
Τυπικό Σφάλμα	2,115351218	Τυπικό Σφάλμα	0,030953	Τυπικό Σφάλμα	0,005135
Διάμεσος	5,65	Διάμεσος	0,184	Διάμεσος	0,0405
Διάμεσος τρόπος	0	Διάμεσος τρόπος	0	Διάμεσος τρόπος	0
Τυπική Απόκλιση	9,46013824	Τυπική Απόκλιση	0,138424	Τυπική Απόκλιση	0,022965
Διακύμανση Δείγματος	89,49421553	Διακύμανση Δείγματος	0,019161	Διακύμανση Δείγματος	0,000527
Κύρτωση	3,856177946	Κύρτωση	-0,90473	Κύρτωση	-1,32393
Ασυμμετρία	1,785935474	Ασυμμετρία	0,061428	Ασυμμετρία	-0,30552
Εύρος	37,5	Εύρος	0,45	Εύρος	0,066
Ελάχιστο	0	Ελάχιστο	0	Ελάχιστο	0
Μέγιστο	37,5	Μέγιστο	0,45	Μέγιστο	0,066
Άθροισμα	161,39	Άθροισμα	3,4902	Άθροισμα	0,6145
Καταμέτρηση	20	Καταμέτρηση	20	Καταμέτρηση	20
Μεγαλύτερο(1)	37,5	Μεγαλύτερο(1)	0,45	Μεγαλύτερο(1)	0,066
Μικρότερο(1)	0	Μικρότερο(1)	0	Μικρότερο(1)	0
Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	4,427482359	Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	0,064784	Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	0,010748

ΕΜΦΥΤΕΥΣΕΙΣ – ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ

Πίνακας 27Α. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε διάφορους συνδυασμούς φωτοπεριόδου με αρχικά φως και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Αρχικά φως (24 ώρες)	Καλογένεση (%)	Νωπό Βάρος (g)	Ξηρό Βάρος (g)
Επαγωγή κάλου			
4 εβδ. φως	4,0	0,245	0,044
3 εβδ. Φως, 1 εβδ. Σκοτάδι	3,0	0,216	0,040
2 εβδ. Φως, 2 εβδ. σκοτάδι	3,0	0,202	0,036
1 εβδ. Φως, 1 εβδ. σκοτάδι	3,0	0,212	0,038
4 εβδ. σκοτάδι	0,0	0,0	0,0

Πίνακας 27B. Ανάπτυξη εκφύτων ιξού σε διάφορους συνδυασμούς φωτοπεριόδου με αρχικά σκοτάδι και μέτρηση Νωπού και Ξηρού Βάρους

Αρχικά σκοτάδι	Καλογένεση	Νωπό Βάρος	Ξηρό Βάρος
(24 ώρες)	(%)	(g)	(g)
Επαγωγή κάλου			
4 εβδ. φως	2,3	0,134	0,021
3 εβδ. Φως, 1 εβδ. Σκοτάδι	1,9	0,123	0,019
2 εβδ. Φως, 2 εβδ. σκοτάδι	2,0	0,108	0,012
1 εβδ. Φως, 1 εβδ. σκοτάδι	2,0	0,09	0,008
4 εβδ. σκοτάδι	0,0	0,0	0,0

ΠΙΝΑΚΑΣ 27Γ. Ανάλυση αποτελεσμάτων καλογένεσης από έκφυτα ιξού μετά από την επίδραση φωτοπεριόδου.

	Αρχικά φως (24 ώρες)		Αρχικά σκοτάδι (24 ώρες)
Μέσος	2,6	Μέσος	1,64
Τυπικό Σφάλμα	0,678232998	Τυπικό Σφάλμα	0,415451562
Διάμεσος	3	Διάμεσος	2
Διάμεσος τρόπος	3	Διάμεσος τρόπος	2
Τυπική Απόκλιση	1,516575089	Τυπική Απόκλιση	0,928977933
Διακύμανση Δείγματος	2,3	Διακύμανση Δείγματος	0,863
Κύρτωση	3,724007561	Κύρτωση	4,523778514
Ασυμμετρία	-1,74879169	Ασυμμετρία	- 2,085422737
Εύρος	4	Εύρος	2,3
Ελάχιστο	0	Ελάχιστο	0
Μέγιστο	4	Μέγιστο	2,3
Άθροισμα	13	Άθροισμα	8,2
Καταμέτρηση	5	Καταμέτρηση	5
Μεγαλύτερο(1)	4	Μεγαλύτερο(1)	2,3

Μικρότερο(1)	0	Μικρότερο(1)	0
Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	1,883080589	Επίπεδο Σημαντικότητας(95,0%)	1,153480844

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Ανάλυση Μακροστοιχείων και Μικροστοιχείων

Συσσωρευση επιλεγμένων μακροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού: επίδραση της σύνθεσης του καλλιεργητικού μέσου και της προέλευσης του εκφύτου.

Οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε καλλιέργειες κάλου από ιξό που χρησιμοποιήθηκαν σε απόκριση με τις επεμβάσεις με διαφορετικούς ρυθμιστές αύξησης και πηγή εκφύτων (φύλλο ή βλαστό).

Πίνακας 31Α. Συσσωρευση μακροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού, ανάλογα με τον χρόνο επώασης της καλλιέργειας και των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

Διάρκεια Καλλιέργειας (εβδομάδες)	Βάρος κάλων	K	P	Ca	Mg/1000
2	0,518	0,2072	0,047	0,291	0
3	0,14	0,0154	0,003	0,017	0,08316
4	0,357	0,0856	0,015	0,107	0,042126
5	0,225	0,063	0,007	0,05	0,035325
7	0,268	0,0643	0,011	0,075	0,043416
8	0,273	0,1092	0,0151	0,04	0,055146
9	0,443	0,1772	0,031	0,072	0,108535
10	0,547	0,547	0,0565	0,128	0,311243

Πίνακας 31B. Αναλυτικός πίνακας των συγκεντρώσεων μακροστοιχείων (% ξηρού βάρους) κάλων που προέκυψαν από την ιστοκαλλιέργεια εκφύτων ιξού.

Κωδικός δείγματος	Βάρος	Μετρήσεις στο Κ σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Φώσφορο σε ppm	Μετρήσεις στο Mg σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Ca σε % Ξ.Ο.
1	0,518	0,2072	0,047	0	0,291
2	0,14	0,0154	0,003	83,16	0,017
3	0,357	0,0856	0,015	42,126	0,107
4	0,225	0,063	0,007	35,325	0,05
5	0,215	0,0215	0,002	26,445	0,052
6	0,268	0,0643	0,011	43,416	0,075
7	0,273	0,1092	0,0151	55,146	0,04
8	0,443	0,1772	0,031	108,535	0,072
9	0,547	0,547	0,0565	311,243	0,128
10	0,226	0,029	0,002	48,816	0,112
11	0,121	0,0096	0,0014	10,769	0,011
12	0,46	0,1288	0,0356	138,92	0,065
13	0,195	0,0468	0,0064	31,395	0,021
14	0,05	0,001	0	1,85	0,005
15	0,228	0,0638	0,013	40,812	0,029
16	0,122	0,017	0,0025	11,956	0,01
17	0,314	0,0188	0,0026	24,178	0,027
18	0,07	0,0147	0,0027	13,93	0,028
19	0,118	0,0188	0,0038	16,992	0,025
20	0,149	0,0178	0,0032	16,986	0,045
21	0,11	0,003	0,0008	8,03	0,027
22	0,104	0,007	0,0008	6,448	0,008
23	0,55	0,022	0,0032	31,9	0,065
24	0,26	0,013	0,0003	19,5	0,052
25	0,057	0,0017	0,0003	2,793	0,005
26	0,039	0,0007	0	1,443	0,003
27	0,044	0,0008	0	2,244	0,003
28	0,178	0,0409	0,0066	31,328	0,004
29	0,055	0,0033	0,0005	3,465	0,005
30	0,066	0,0132	0,0028	10,296	0,001
31	0,397	0,001	0,0328	22,424	0,001
32	0,011	0,019	0,0009	36,87	0,056
33	0,415	0,0294	0,03	1,6	0,015
34	0,484	0,0514	0,023	5,672	0,1
35	0,078	0,1302	0,005	17,833	0,002
36	0,405	0,0003	0,03	16,822	0,003
37	0,26	0,0032	0,015	16,833	0,003
38	0,455	0,1998	0,003	53,815	0,003
39	0,263	0,35	0,013	56,9	0,003
Φύλλο ιξού	1	3	0,06	0,2177	2,077
Βλαστός Ιξού	1	1,6	0,13	0,2492	2,851
Έλατο	1	0,8	1,2	0,144	0,851
Βελανιδιά	1	0,9	1,34	0,1243	1,768
Καστανιά	1	0,9	1,02	0,2508	0,893

Πίνακας 31Γ. Συσχέτιση συσσώρευσης μακροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ξηρού, ανάλογα με τον χρόνο επώασης της καλλιέργειας και των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

	Διάρκεια Καλλιέργειας	Ξ.Β.	K	P	Ca	Mg/1000
Διάρκεια Καλλιέργειας	1					
Ξ.Β.	0,302016271	1				
K	0,546668691	0,810831	1			
P	0,31422565	0,958417	0,898444	1		
Ca	-	0,74708	0,404598	0,719562	1	
Mg/1000	0,68157361	0,450397	0,851484	0,573801	-	1

Πίνακας 31Δ. Αναλυτικός πίνακας των συγκεντρώσεων μακροστοιχείων (επί ξηρού βάρους, % κι επί 10) σε κάλους που προέκυψαν από την ιστοκαλλιέργεια εκφύτων

Κωδικός δείγματος	Βάρος	Μετρήσεις στο K σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Φόσφορο σε ppm	Μετρήσεις στο Ca σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Mg σε % Ξ.Ο.	Cax10	Kx10	Px10
βλαστός-1	0,121	0,0096	0,0014	0,011	10,769	0,11	0,096	0,014
βλαστός -2	0,46	0,1288	0,0356	0,065	138,92	0,65	1,288	0,356
βλαστός -3	0,195	0,0468	0,0064	0,021	31,395	0,21	0,468	0,064
βλαστός -4	0,05	0,001	0	0,005	1,85	0,05	0,01	0
βλαστός -5	0,122	0,017	0,0025	0,01	11,956	0,1	0,17	0,025
βλαστός -6	0,314	0,0188	0,0026	0,027	24,178	0,27	0,188	0,026
βλαστός -7	0,07	0,0147	0,0027	0,028	13,93	0,28	0,147	0,027
βλαστός -8	0,118	0,0188	0,0038	0,025	16,992	0,25	0,188	0,038
βλαστός -9	0,149	0,0178	0,0032	0,045	16,986	0,45	0,178	0,032
βλαστός -10	0,11	0,003	0,0008	0,027	8,03	0,27	0,03	0,008
φύλλο-1	0,104	0,007	0,0008	0,008	6,448	0,08	0,07	0,008
φύλλο -2	0,55	0,022	0,0032	0,065	31,9	0,65	0,22	0,032
φύλλο -3	0,26	0,013	0,0003	0,052	19,5	0,52	0,13	0,003
φύλλο -4	0,057	0,0017	0,0003	0,005	2,793	0,05	0,017	0,003
φύλλο -5	0,039	0,0007	0	0,003	1,443	0,03	0,007	0
φύλλο -6	0,044	0,0008	0	0,003	2,244	0,03	0,008	0
φύλλο -7	0,178	0,0409	0,0066	0,004	31,328	0,04	0,409	0,066
φύλλο -8	0,055	0,0033	0,0005	0,005	3,465	0,05	0,033	0,005
φύλλο -9	0,066	0,0132	0,0028	0,001	10,296	0,01	0,132	0,028
φύλλο -10	0,011	0,019	0,0009	0,056	36,87	0,56	0,19	0,009
Φύλλο ξηρού	1	3	0,06	2,077	0,2177	2,077	3	0,06
Βλαστός Ξηρού	1	1,6	0,13	2,851	0,2492	2,851	1,6	0,13
Έλατο	1	0,8	1,2	0,851	0,144	0,851	0,8	1,2
Βελανιδιά	1	0,9	1,34	1,768	0,1243	1,768	0,9	1,34
Καστανιά	1	0,9	1,02	0,893	0,2508	0,893	0,9	1,02
M.O. βλαστών	0,1709	0,02763	0,0059	0,0264	27,5006	0,264	0,2763	0,059
M.O. φύλλων	0,1364	0,01216	0,00154	0,0202	14,6287	0,202	0,1216	0,0154

ιξού, σε σχέση με την διάρκεια καλλιέργειας εκφύτων ιξού.

Πίνακας 33Α. Συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και μικροστοιχείων από καλλιέργειες κάλων ιξού με βάση τους διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης.

	Βάρος	Px100	Kx100	Ca x100	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B
βλαστός-1	0,484	2,3	5,14	1	5,672	2,515	3,456	2,32	0,673	24,714
βλαστός-23	0,405	3	0,03	0,3	16,822	14,566	0,859	7,818	0,133	19,12
φύλλο -1	0,078	0,5	13,02	0,2	17,833	12,3	1,698	5,615	0,262	32,562
φύλλο -23	0,26	1,5	0,32	0,3	16,833	28,143	0,656	0,515	0,437	5,25

Πίνακας 36Α. Συσώρευση μικροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού, ανάλογα με τον χρόνο επώασης της καλλιέργειας και των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους

Κωδικός δείγματος	Βάρος	Μετρήσεις στο Fe σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Mn σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Zn σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Cu σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Βόριο σε ppm
1	0,518	38,85	14,504	22,274	2,072	13,79
2	0,14	3,22	2,52	6,000	0,14	16,69
3	0,357	21,42	6,426	9,639	0,714	20,96
4	0,225	14,625	3,825	3,6	0,45	20,86
5	0,215	9,46	3,655	3,44	0,42	22,13
6	0,268	18,492	5,896	4,824	0,536	28,19
7	0,273	13,65	3,822	5,46	0,546	23,76
8	0,443	34,995	8,417	12,847	1,329	43,3
9	0,547	70,016	45,948	28,444	1,094	8,343
10	0,226	9,718	9,266	4,972	0,226	3,408
11	0,121	2,299	1,694	1,089	0,121	4,273
12	0,46	27,14	16,56	11,04	0,92	5,901
13	0,195	6,24	4,875	2,925	0,39	5,087
14	0,05	1,25	0,2	0,4	0,05	5,087
15	0,228	15,504	6,84	8,208	0,056	6,817
16	0,122	3,904	1,708	2,196	0,244	10,28
17	0,314	13,502	6,9	4,71	0,628	7,58
18	0,07	5,81	1,96	1,96	0,14	10,68
19	0,118	3,658	2,596	1,888	0,354	7,58
20	0,149	4,47	3,129	1,937	0,447	10,68
21	0,11	3,74	1,76	1,87	0,22	15,16
22	0,104	1,144	0,624	0,832	0,208	4,527
23	0,55	9,9	2,2	5,5	0,1	14,19
24	0,26	8,06	3,64	2,6	0,6	23,71
25	0,057	1,71	0,342	0,741	0,114	11,7
26	0,039	1,638	0,234	0,429	0,078	1,729
27	0,044	1,188	0,528	0,484	0,132	7,631
28	0,178	12,104	7,298	3,916	0,51	14,5
29	0,055	1,045	0,275	0,385	0,11	0,863

30	0,066	2,904	1,98	1,056	0,132	46,76
31	0,397	40,56	0,2	3,456	0,005	19,272
32	0,011	19,818	7,565	2,212	0,05	3,412
33	0,415	4,616	8,988	0,08	0,112	22,556
34	0,484	2,515	3,456	2,32	0,673	24,714
35	0,078	12,3	1,698	5,615	0,262	32,562
36	0,405	14,566	0,859	7,818	0,133	19,12
37	0,26	28,143	0,656	0,515	0,437	5,25
38	0,455	8,7	0,455	0,818	0,655	16,87
39	0,263	1,904	0,3	5,5	0,154	23,25
Φύλλο ιξού	1	0,0073	0,0121	0,0162	0,002	46,81
Βλαστός Ιξού	1	0,0051	0,0023	0,0072	0,003	37,3
Έλατο	1	0,0054	0,0058	0,0032	0,002	21,15
Βελανιδι ά	1	0,0074	0,0115	0,0038	0,005	24,38
Καστανιά	1	0,0043	0,0087	0,0027	0,004	23,12

Πίνακας 36B. Αναλυτικός πίνακας συσχέτισης των συγκεντρώσεων μικροστοιχείων επί του ξηρού βάρους και της διάρκειας καλλιέργειας εκφύτων ιξού.

	Διάρκεια Καλλιέργειας	Ξ.Β.	Fe	Mn	Zn	Cux10	B
Διάρκεια Καλλιέργειας	1						
Ξ.Β.	0,302016271	1					
Fe	0,486563539	0,913897	1				
Mn	0,474002894	0,738738	0,937136	1			
Zn	0,203813397	0,907122	0,932751	0,884143	1		
Cux10	-	0,87022	0,64551	0,39879	0,742426	1	
B	0,328152903	-0,13797	-0,28799	-0,51285	-0,44976	0,02797	1

Πίνακας 36Γ. Αναλυτικός πίνακας συσχέτισης των επεμβάσεων στα διαφορετικά ιστοκαλλιεργητικά μέσα και στην ιστοκαλλιέργεια εκφύτων ιξού προερχόμενα από διαφορετικά έκφυτα (βλαστούς, φύλλα).

	βλαστός 1	βλαστός 2	βλαστός 3	βλαστός 4	βλαστός 5	βλαστός 6	βλαστός 7	βλαστός 8	βλαστός 9	βλαστός 10
βλαστός 1	1									
βλαστός 2	0,605346	1								
βλαστός 3	0,609355	0,609376919	1							
βλαστός 4	0,489948	0,551326741	0,773835642	1						
βλαστός 5	0,460248	0,396735908	0,720219125	0,861756087	1					
βλαστός 6	0,533997	0,798018317	0,534609599	0,555038049	0,279737217	1				
βλαστός 7	0,613637	0,736063523	0,825459093	0,836357974	0,743351833	0,725700631	1			
βλαστός 8	0,510445	0,542824826	0,63571906	0,734341098	0,789200912	0,410840521	0,769190966	1		
βλαστός 9	0,761739	0,630929915	0,812170205	0,695137653	0,583244642	0,554398173	0,794248289	0,625873993	1	
βλαστός 10	0,25071	0,212103802	0,085340493	0,075737506	0,028170172	0,045872747	0,102638175	0,16606436	0,188808711	1

	φύλλο 1	φύλλο 4	φύλλο 5	φύλλο 6	φύλλο 7	φύλλο 8	φύλλο 9	φύλλο 10
φύλλο 1	1							
φύλλο 2	-0,25657							
φύλλο 3	-0,18958							
φύλλο 4	-0,15922	1						
φύλλο 5	-0,07312	0,943024	1					
φύλλο 6	0,842982	-0,30771	-0,25616	1				
φύλλο 7	-0,11457	0,905329	0,937815	-0,345	1			
φύλλο 8	0,792599	-0,2706	-0,22089	0,881548	-0,30788	1		
φύλλο 9	0,730398	-0,26541	-0,22043	0,477826	-0,30013	0,353795	1	
φύλλο 10	0,606592	-0,26473	-0,24569	0,676902	-0,26678	0,709486	0,28021	1

Πίνακας 36Α1. Πίνακας συσσώρευσης μικροστοιχείων σε ιστοκαλλιέργειες ιξού, ανάλογα με τον χρόνο επώασης της καλλιέργειας και των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους

Κωδικός δείγματος	Βάρος	Μετρήσεις στο Fe σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Mn σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Zn σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Cu σε % Ξ.Ο.	Μετρήσεις στο Βόριο σε ppm
βλαστός-1	0,121	2,299	1,694	1,089	0,121	4,273
βλαστός -2	0,46	27,14	16,56	11,04	0,92	5,901
βλαστός -3	0,195	6,24	4,875	2,925	0,39	5,087
βλαστός -4	0,05	1,25	0,2	0,4	0,05	5,087
βλαστός -5	0,122	3,904	1,708	2,196	0,244	10,28
βλαστός -6	0,314	13,502	6,9	4,71	0,628	7,58
βλαστός -7	0,07	5,81	1,96	1,96	0,14	10,68
βλαστός -8	0,118	3,658	2,596	1,888	0,354	7,58
βλαστός -9	0,149	4,47	3,129	1,937	0,447	10,68
βλαστός -10	0,11	3,74	1,76	1,87	0,22	15,16
φύλλο-1	0,104	1,144	0,624	0,832	0,208	4,527
φύλλο -2	0,55	9,9	2,2	5,5	0,1	14,19
φύλλο -3	0,26	8,06	3,64	2,6	0,6	23,71
φύλλο -4	0,057	1,71	0,342	0,741	0,114	11,7
φύλλο -5	0,039	1,638	0,234	0,429	0,078	1,729
φύλλο -6	0,044	1,188	0,528	0,484	0,132	7,631
φύλλο -7	0,178	12,104	7,298	3,916	0,51	14,5
φύλλο -8	0,055	1,045	0,275	0,385	0,11	0,863
φύλλο -9	0,066	2,904	1,98	1,056	0,132	46,76
φύλλο -10	0,011	19,818	7,565	2,212	0,05	3,412
Φύλλο ιξού	1	0,0073	0,0121	0,0162	0,002	46,81
Βλαστός Ιξού	1	0,0051	0,0023	0,0072	0,003	37,3
Έλατο	1	0,0054	0,0058	0,0032	0,002	21,15
Βελανιδιά	1	0,0074	0,0115	0,0038	0,005	24,38
Καστανιά	1	0,0043	0,0087	0,0027	0,004	23,12
M.O. βλαστών	0,1709	7,2013	4,1382	3,0015	0,3514	8,2308
M.O. φύλλων	0,1364	5,9511	2,4686	1,8155	0,2034	12,9022

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ

Πίνακας 37. Συσσώρευση μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε κάλους ιξού (βλαστού και φύλλου) προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και 10% ασκορβικού οξέος, ανάλογα των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

	βλαστός	φύλλο	Βλαστός +ασκ οξύ	Φύλλο + ασκ οξύ
K	0,009693	0,007	0,0514	0,1302
P	0,0014	0,0008	0,023	0,005
Ca	0,011	0,008167	0,1	0,002133
Mg	10,76877	6,448	5,672	17,833

	βλαστός	φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο + ασκ. οξύ
Fe	2,299	1,144	2,515	12,3
Mn	1,694	0,623933	3,456	1,698
Zn	1,089	0,8312	2,32	5,615
Cu	0,121	0,208	0,673	0,262
B	4,273	4,526	24,714	32,562

Πίνακας 37Α. Συσχέτιση της συσσώρευσης μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε κάλους ιξού (βλαστού και φύλλου) προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και 10% ασκορβικού οξέος, ανάλογα των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

	βλαστός	φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο + ασκ. οξύ	
K	1				
P	0,1969	1			
Ca	-0,05374	0,968409	1		
Mg	0,774636	-0,38632	-0,5886	1	
	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Fe	1				
Mn	0,004372	1			
Zn	0,974272	0,19463	1		
Cu	-0,08863	0,863364	0,137925	1	
B	0,787371	0,541055	0,905854	0,544238	1

Πίνακας 37B1. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επεμβάσεων με ασκορβικό οξύ, για τα στοιχεία φώσφορο και ψευδάργυρο, στη συσσώρευση μακροστοιχείων

και μικροστοιχείων σε κάλους ιξού (βλαστού και φύλλου) προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και 10% ασκορβικού οξέος, ανάλογα των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

	Βλαστός	Φύλλο	Βλαστός +ασκ. οξύ	Φύλλο+ ασκ. οξύ	Valid N
M.O.	1,69400	0,62393	3,45600	1,69800	3
M.O. (P2.sta)					
4 Μεταβλητές					
	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός +ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Valid N
M.O.	0,0014	0,0008	0,023	0,005	3
M.O. (Zn2.sta)					
4 Μεταβλητές					
	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός +ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Valid N
Μέσος	1,08900	0,83120	2,32000	5,61500	3

Πίνακας 37B2. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων των επεμβάσεων με ασκορβικό οξύ, για τα στοιχεία ασβέστιο, σίδηρο και κάλλιο στη συσσώρευση μακροστοιχείων και μικροστοιχείων σε κάλους ιξού (βλαστού και φύλλου) προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/lit και 10% ασκορβικού οξέος, ανάλογα των συγκεντρώσεων επί ξηρού βάρους.

	Βλαστός	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός + ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο+ ασκ. οξύ	Valid N
Μέσα	4,273	4,52600	22,55600	3,41200	24,71400	32,56200	16,87	5,25	3
Mέσα (Ca2.sta)									
8 Μεταβλητές									
	Βλαστός	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός + ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο+ ασκ. οξύ	Valid N

Μέσα	0,011	0,00817	0,01500	0,05600	0,10000	0,00213	0,003	0,00303	3
Μέσα (Fe2.sta)									
8 Μεταβλητέ ς									
	Βλαστός	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός + ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο+ ασκ. οξύ	Valid N
Μέσα	2,299	1,14400	4,61600	19,81800	2,51500	12,30000	8,7	28,14297	3
Μέσα (K2.sta)									
8 Μεταβλητέ ς									
	Βλαστός	Βλαστός (N)	Φύλλο (N)	Βλαστός + ασκ. οξύ (N)	Φύλλο+ ασκ. οξύ (N)	Φύλλο	Βλαστός + ασκ. οξύ	Φύλλο+ ασκ. οξύ	Valid N
Μέσος	0,00969	0,007	0,0294	0,01900	0,05140	0,13020	0,1998	0,0032	3

Πίνακας 38. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων ολικής απορρόφησης φαινολικών σε κάλους ιξού προερχόμενους από υπόστρωμα με και χωρίς ασκορβικό οξύ.

					Με Ασκορβικό οξύ	
			Φαινολικά			
		+Ασκορβ. οξύ	0,32	0,35	0,01	-0,01
		- Ασκορβ. οξύ	0,235	0,213	0,09	0,05
		Κάλος χωρίς Ασκορβ. οξύ				0,335
		Anova: Single Factor				0,224
		ΣΥΝΟΨΗ				
		<i>Κατηγορίες</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Αθροισμα</i>	<i>Μ.Ο.</i>	<i>Διαφορά</i>
		Χειρισμοί απομόνωσης πρωτοπλαστών	2	0,67	0,335	0,00045
		Βιωσιμότητα πρωτοπλαστών	2	0,448	0,224	0,000242

ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	0,012321	1	0,012321	35,60983	0,026952	18,51276
Υπόλοιπο	0,000692	2	0,000346			
Σύνολο	0,013013	3				
+ ασκορβ. οξύ						
Anova: Single Factor						
<i>Κατηγορίες Επεμβάσεων</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>M.O.</i>	<i>Διαφορά</i>		
Χειρισμοί απομόνωσης πρωτοπλαστών	2	0	0	0,0002		
Βιωσιμότητα πρωτοπλαστών	2	0,14	0,07	0,0008		
ANOVA						
<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	0,0049	1	0,0049	9,8	0,088678	18,51276
Υπόλοιπο	0,001	2	0,0005			
Σύνολο	0,0059	3				

Πίνακας 39. Περιγραφή των επεμβάσεων σε έκφυτα ιξού (δότης και κάλος) σε σχέση με την απόδοση και την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών (%)

Αριθμός Επεμβάσεων	Επεμβάσεις	Είδος εκφύτου	Απόδοση Πρωτοπλαστών (%)	Βιωσιμότητα Πρωτοπλαστών (%)
1	8P, 7C	φύλλα	20	100
2	8P, 14C	φύλλα	43	100
3	16P, 7C	φύλλα	57,5	75
4	16P, 14C	φύλλα	100	100
1	8P, 7C	κάλος φ.	75	100
2	8P, 14C	κάλος φ.	50	0
3	16P, 7C	κάλος φ.	80	20
4	16P, 14C	κάλος φ.	0	0

Η στατιστική επεξεργασία δεδομένων που έγινε (στατιστική ανάλυση) δείχνει ότι υπάρχει διαφορά στατιστικά σημαντική μεταξύ όλων των επεμβάσεων και τιμών (σύγκριση και ανά δύο) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 39Α. Στατιστική ανάλυση με βάση το ANOVA (Single Factor) των επεμβάσεων σε έκφυτα ιζού (δότης-κάλου) σε σχέση με την απόδοση και την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών.

Ανάλυση της Διακύμανσης Ανοva: Single Factor				
ΣΥΝΟΨΗ				
<i>Επεμβάσεις</i>	<i>Καταμέτρηση</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μ.Ο.</i>	<i>Διαφορά</i>
8P, 7C φύλλα	3	60	20	4
8P, 14C φύλλα	3	129	43	4
16P, 7C φύλλα	3	172,5	57,5	4
16P, 14C φύλλα	3	300	100	4
8P, 7C κάλος φ	3	225	75	4
8P, 14C κάλος φ	3	150	50	4
16P, 7C κάλος φ	3	240	80	4
16P, 14C κάλος φ	3	0	0	0

Πίνακας 39Β. Στατιστική ανάλυση με βάση την πηγή Παραλλακτικότητας των επεμβάσεων σε έκφυτα ιζού (δότης-κάλου) σε σχέση με την απόδοση και την βιωσιμότητα των πρωτοπλαστών.

<i>Πηγή Παραλλακτικότητας</i>	<i>AT</i>	<i>BE</i>	<i>MT</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Επεμβάσεις	22346,906	7	3192,4152	912,1186	1,35E-19	2,657195
Υπόλοιπο	56	16	3,5			
Σύνολο	22402,906	23				

ΠΑΡΑΓΩΓΗ-ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Πίνακας 40. Τιμές φασματοφωτομέτρησης πρωτεϊνών ανά g βάρους και Μέσο όρο βάρους κάλου (g). Οι κάλοι προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια βλαστού ιζού σε θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 NAA mg/l.

595/g	μ.ο.β.κ.(g)
0,015	1,84
0,009	3,73
0,012	2,42
0,082	1,76
0,102	1,51

0,12	0,56
0,088	1,83
0,08	1,99
0,103	1,11
0,086	1,79
0,146	1,13
0,184	0,8
0,295	1,1
0,223	0,55
0,166	2,04
0,235	1,06
0,071	1,56
0,13	1,88
0,118	2,6
0,089	1,41

Πίνακας 40Α. Καταγραφή συχνότητας διακύμανσης συγκέντρωσης πρωτεΐνης (μg/g νωπού βάρους κάλου) σε κάλους ιξού (*Viscum album*) προερχόμενους από έκφυτα βλαστών

Αριθμός Δείγματος Πρωτεϊνών	% ιστού κάλου	Αριθμός Δείγματος Πρωτεϊνών	% ιστού κάλου
1	30	5	15
2	15	6	10
3	15	7	10
4	5		

Πίνακας 40.Β. Καταγραφή συχνότητας διακύμανσης του Νωπού Βάρους (g) σε κάλους ιξού προερχόμενους από έκφυτα βλαστών (*Viscum album*).

Αριθμός Δείγματος Πρωτεϊνών	% ιστού κάλου
1	15
2	25
3	40
4	10
5	5
6	5

Εικόνα 12. : Θάμνος ιξού, πάνω σε κλαδί ελάτου (ξενιστής) στην Πάρνηθα, πάνω στο οποίο ημι-παρασιτεί. Ο ιξός, διακρίνεται από το ανοιχτότερο χρώμα του φυλλώματός του.



Εικόνα 13. : Θάμνος ιξού, έτσι όπως κρέμεται από ένα κλαδί δέντρου, πάνω στο οποίο ημι-παρασιτεί. Διακρίνονται φύλλα (λογχοειδή), κλαδιά και καρποί (λευκοί) του ιξού (Ξενιστής έλατο, όρος Πάρνηθα).



Εικόνα 14. : Τα σχήματα που διακρίνονται πάνω στα κλαδιά του δέντρου είναι θάμνοι του φυτού ιξού, έτσι όπως σχηματίζονται πάνω στα δέντρα που ημιπαρασιτούν (ξεμιστής: Βελανιδιά, περιοχή Μεγαλόπολης).



Εικόνα 15. : Καρποί του ιξού. Οι καρποί του ιξού είναι λευκοί και στο εσωτερικό τους περιέχουν ζελατινώδη μάζα.



Εικόνα 16. : Τα σχήματα που διακρίνονται πάνω στα κλαδιά του δέντρου είναι θάμνοι του φυτού ιξού, έτσι όπως σχηματίζονται πάνω στα δέντρα που ημιπαρασιτούν. Το δέντρο-ξενιστής έχει ήδη αρχίσει να μαραίνεται από τον ημιπαρασιτισμό, ιδιαίτερα τα χαμηλότερα κλαδιά του στα οποία οι θάμνοι του ιξού είναι και περισσότεροι. (Ξενιστής έλατο στο όρος Πάρνηθα).



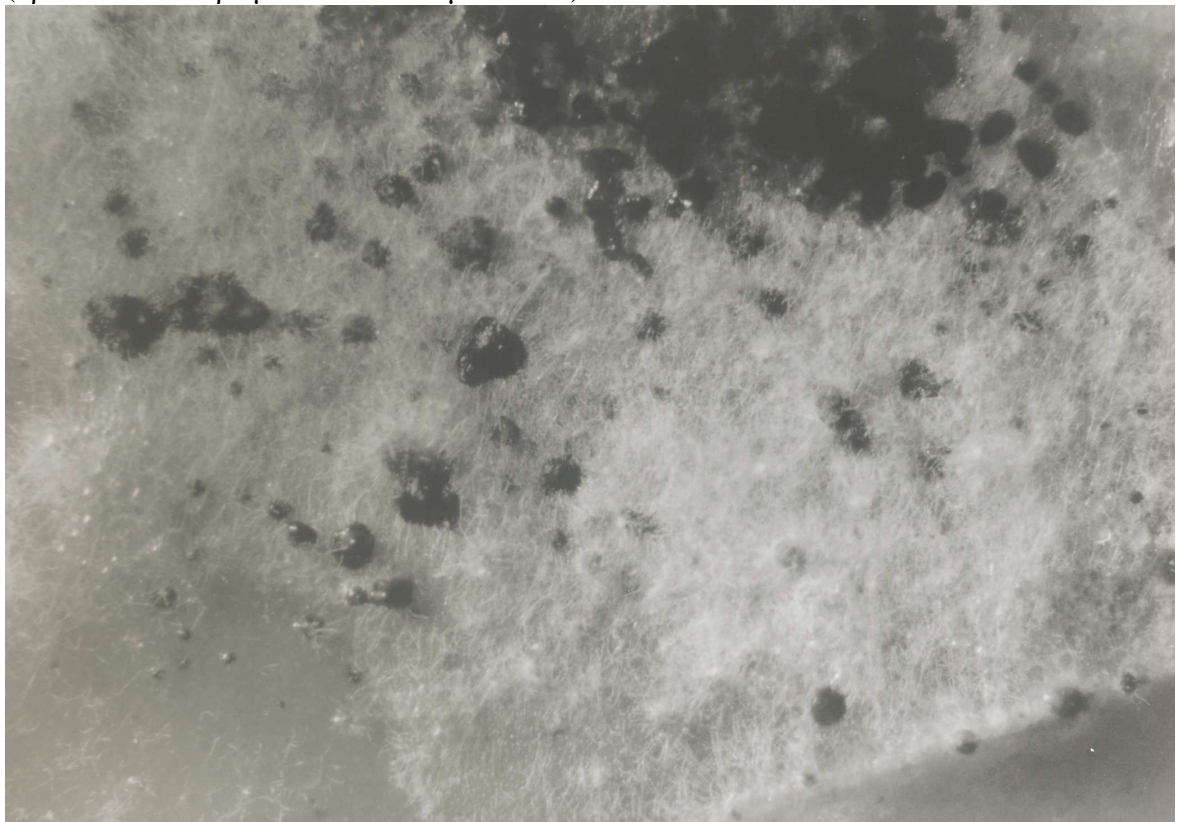
Εικόνα 17. : Διακρίνονται ανθήρες του ιξού και τα χαρακτηριστικά λογχοειδή φύλλα του.



Εικόνα 18. : Πρωτοπλάστης ιξού απομονωμένος από ιστό φύλλου (scale bar = 100 μM).



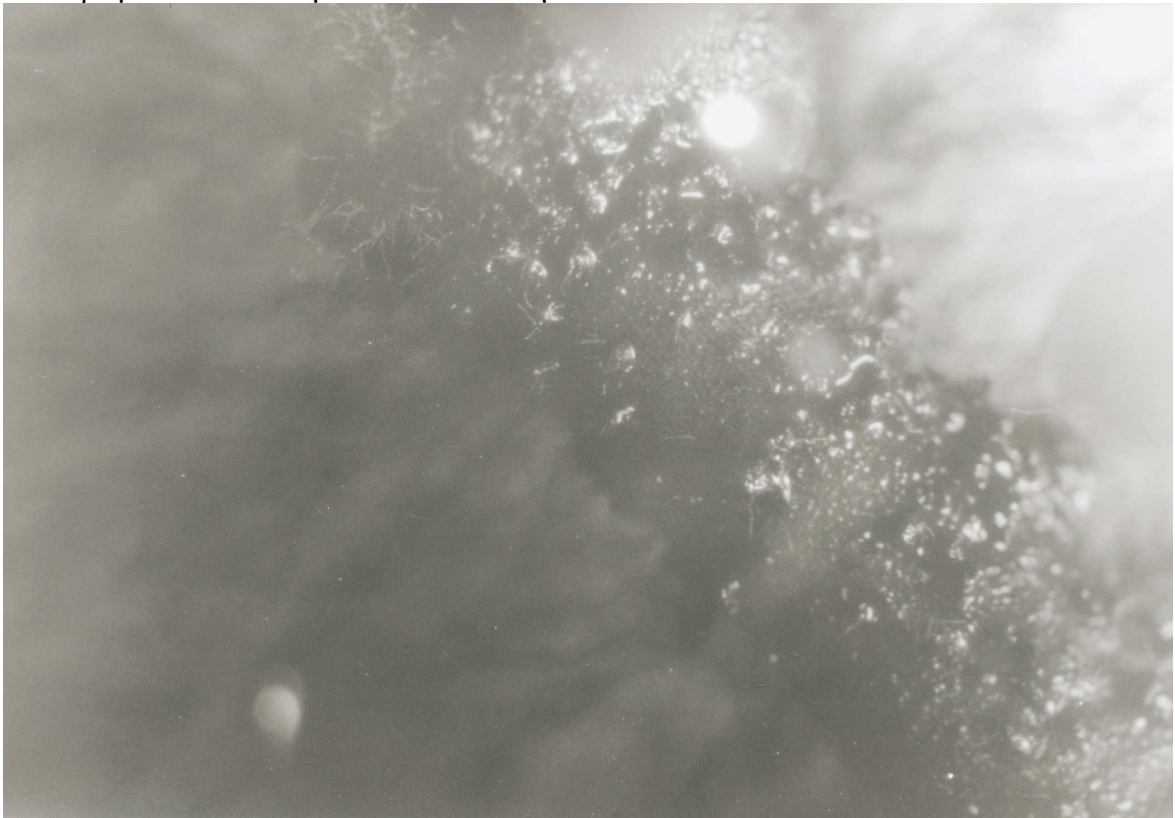
Εικόνα 19. : Κάλυκοι επαγόμενοι από φύλλα ιξού και καρποφορίες δομών σαν σπόροι (θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μM NAA)



Εικόνα 20. : Κάλαι επαγόμενοι από φύλλα ιξού και καρποφορίες δομών σαν σπόροι και νημάτια (θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μ M NAA)



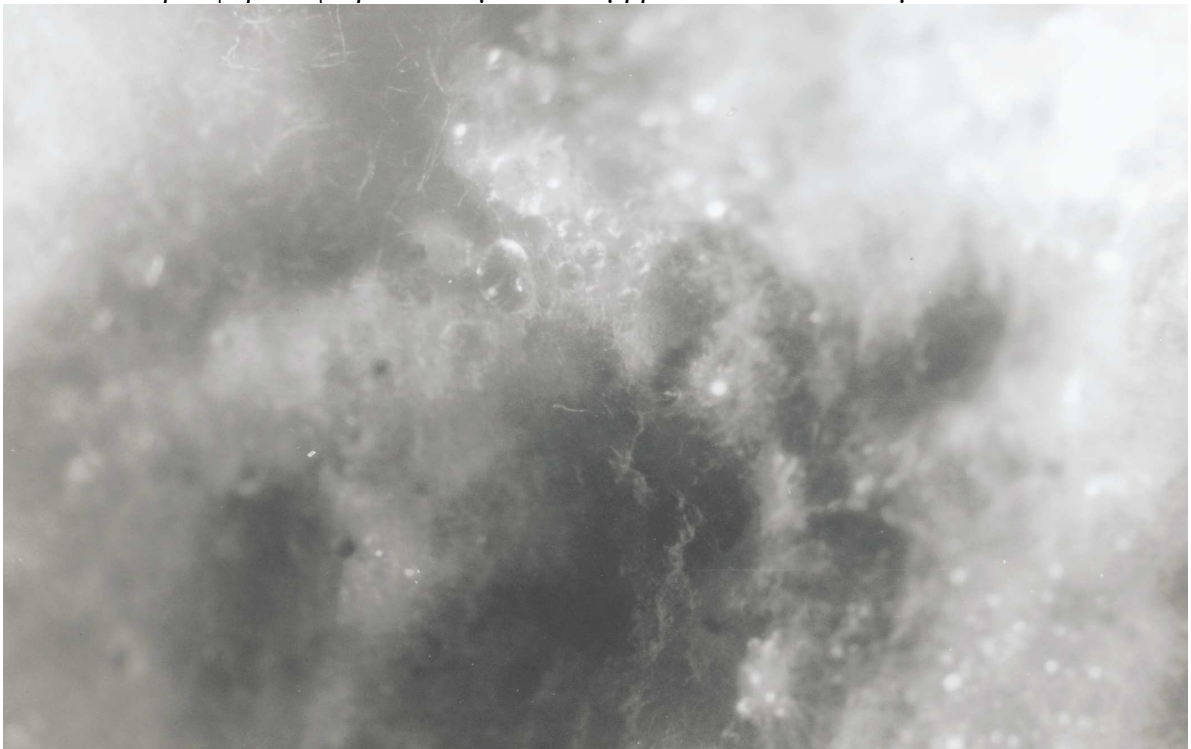
Εικόνα 21. : Νημάτια σαν ρίζες επαγόμενα από βλαστούς ιξού σε θρεπτικό υπόστρωμα MS + 4.95 μ M NAA + 2.82 μ M BA



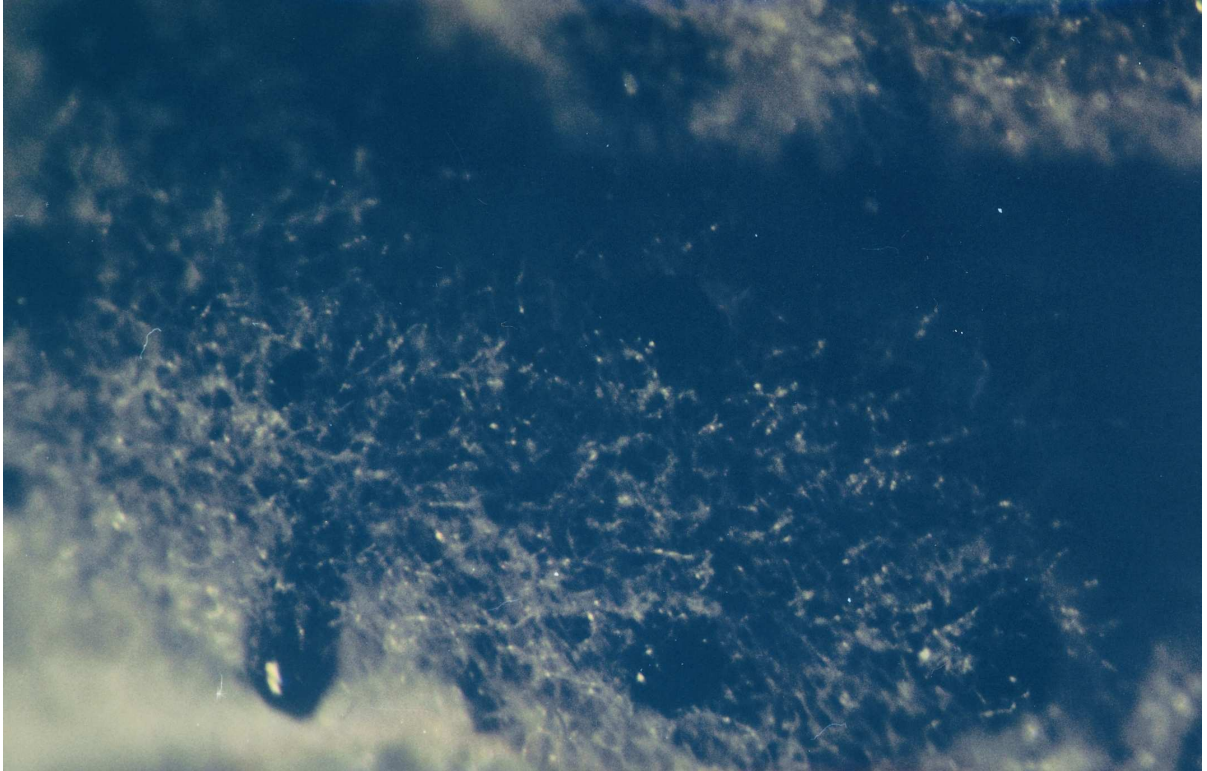
Εικόνα 22. : Λευκό ροζ κάλοι επαγόμενοι από φύλλα ιξού σε MS + 4.95 μ M NAA και καρποφορία σφαιρικών σωματικών εμβρύων σε MS + 4.95 μ M NAA



Εικόνα 23.: Λευκό ροζ κάλοι επαγόμενοι από βλαστούς ιξού σε MS + 4.95 μ M NAA και καρποφορία σφαιρικών σωματικών εμβρύων σε MS + 4.95 μ M NAA



Εικόνα 24. : Κάλοι (μαύρο-καφέ τύπου σε MS θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ασκορβικό οξύ + 4.95 μ M NAA + 2.82 μ M BA, καλυπτόμενοι με προεξοχές νηματίων



Εικόνα 25. (Εξώφυλλο): Άνθος από φυτό ιξού, όπου διακρίνονται ανθήρες (λευκοί, μοιάζουν να σχηματίζουν δίκτυο).



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- S. Kintzios and M. Barberaki (2000) The biotechnology of *Viscum album L*: Tissue culture, Somatic Embryogenesis and Protoplast Isolation. In: *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Approaches: Mistletoe The genus Viscum*. (Ed. A. Bussing) Harwood Academic Publishers. pp. 95–99, Amsterdam.
- S. Kintzios, M. Barberaki, P. Turgelis , Aivalakis G., and Volioti An. (2002) Preliminary evaluation of somaclonal variation for the in vitro production of new toxic proteins from *Viscum album L*. *J. Herbs, Spices & Medicinal Plants* 9, 217-221.
- M. Barberaki, S. Kintzios (2002) Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. *Scientia Horticulturae* 95, pp 133-150.
- S. Kintzios, M. Barberaki, J. Drossopoulos, P. Turgelis , and J. Konstas (2003) Effect of medium composition and explant source on the distribution profiles selected micronutrients in mistletoe tissue cultures. *Journal of Plant Nutrition* Vol. 26, No 2, pp 369-397.
- S. Kintzios and M. Barberaki Editors of the Book (2004): *Plants that fight Cancer*. CRC PRESS LLC: Boca Raton, USA, 2004.

