



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

De novo σύνθεση πρωτεϊνών Ιξού (*Viscum album*) από σωμακλωνικούς κάλλους
και έλεγχος αντινεοπλασματικής δράσης σε καρκινικές σειρές

Βασίλειος Δ. Τσεκούρας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελένη Ντούνη, Καθηγήτρια ΓΠΑ



Αθήνα 2024

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

De novo σύνθεση πρωτεϊνών Ιξού (*Viscum album*) από σωμακλωνικούς κάλλους
και έλεγχος αντινεοπλασματικής δράσης σε καρκινικές σειρές

De novo synthesis of *Viscum album* proteins in somaclonal calluses
and evaluation of antimalignant properties against cancer cell lines

Βασίλειος Δ. Τσεκούρας

Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Σπυρίδων Κίντζιος, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελένη Ντούνη, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Νικόλαος Λάμπρου, Καθηγητή ΓΠΑ

Σοφία Μαυρίκου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γεωργία Μοσχοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Πηνελόπη Μπουζιώτη, Ερευνήτρια ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

De novo σύνθεση πρωτεϊνών Ιξού (*Viscum album*) από σωμακλωνικούς κάλλους και έλεγχος αντινεοπλασματικής δράσης σε καρκινικές σειρές

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Κυτταρικής Τεχνολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Ευρωπαϊκός ιξός, *Viscum album* subsp *abietis*, είναι ένα ημιπαρασιτικό φυτό που περιέχει βιοδραστικές πρωτεΐνες με φαρμακευτικές εφαρμογές στη θεραπεία του καρκίνου. Στον τομέα της βιοτεχνολογίας, η *in vitro* παραγωγή κάλων χρησιμεύει ως μια κρίσιμη εναλλακτική λύση για την παραγωγή βιομάζας και τη βιοσύνθεση φαρμακευτικών ενώσεων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η σωματοκλωνική διαφοροποίηση στις καλλιέργειες κάλλου ιξού μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή νέων πρωτεϊνών.

Σε αυτό το πλαίσιο, αναλύθηκε το πρωτεϊνικό προφίλ από ιστούς και κάλους του *Viscum album* subsp. *abietis* με σκοπό την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι κάλοι προήλθαν από έκφυτα βλαστών και τα φάσματα μάζας των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων υποβλήθηκαν σε πρωτεομική ανάλυση χρησιμοποιώντας ως αναφορά την αναθεωρημένη βάση δεδομένων Uniprot V. Εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στην στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κάλων και των μητρικών φυτών. Ταυτοποιήθηκαν, τέσσερις λεκτίνες ιξού, έξι βισκοτοξίνες και η λεκτίνη πρόσδεσης χιτίνης -cbML. Η διαδικασία της καλογένεσης προκάλεσε αλλαγές στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και στην έκφραση νέων πρωτεϊνικών ισομορφών. Οι κάλοι του γκι βρέθηκαν να έχουν ένα ξεχωριστό βιοσυνθετικό προφίλ πρωτεΐνης σε σύγκριση με τους ιστούς από τα φυτά δότες. Επιπλέον, αυτή η μελέτη διερεύνησε την παραγωγή σωματοκλωνικών πρωτεϊνών κατά την διαδικασία καλογένεσης του ιξού και αξιολόγησε πιθανές κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού και του τραχήλου της μήτρας. Μελετήθηκαν επίσης πιθανά συνεργιστικά αποτελέσματα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε συνδυασμό με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα 5-FU. Η επίδραση των πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων στα κύτταρα HeLa αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία MTT, ενώ η οξειδωτική βλάβη και η επαγωγή απόπτωσης μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μεθόδους carboxy-H₂-DCFDA, MitoSOX™ Red και Caspase-3. Αναπτύχθηκε ένας κυτταρικός βιοαισθητήρας με βάση τα κύτταρα και εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων ανιόντος του σουπεροξειδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών από τα φύλλα και τους μίσχους του γκι είχαν σημαντική επίδραση στα κύτταρα HeLa, προάγοντας οξειδωτική βλάβη και προκαλώντας απόπτωση, ειδικά όταν συνδυάζονταν με την 5-φθοροουρακίλη (5-FU). Αντίθετα, τα εκχυλίσματα ιξού εμφάνισαν τρόπο δράσης παρόμοιο με την καθαρή λεκτίνη Ι γκι (ML-I) και επέδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επιπλέον, πιθανά κυτταροτοξικά αποτελέσματα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ερευνήθηκαν σε δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, την MCF-7 και την τριπλά αρνητική MDA-MB-231, αποκαλύπτοντας σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την 5-FU.

Αυτά τα ευρήματα παρέχουν την δυνατότητα ανακάλυψης νέων βιοδραστικών προϊόντων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον και να ενισχύσουν την κατανόησή για τις βιοχημικές οδούς στις οποίες επιδρούν οι πρωτεΐνες γκι για τη θεραπεία του καρκίνου

Επιστημονική περιοχή: Βιοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: *Viscum album*, ιξός, καλλογένεση, λεκτίνες, αντικαρκινικά μόρια, βιοαισθητήρας

De novo synthesis of *Viscum album* proteins in somaclonal calluses and evaluation of antimalignant properties against cancer cell lines

*Department of Biotechnology
Laboratory of Cell Technology*

ABSTRACT

European mistletoe, *Viscum album* subsp. *abietis*, is a semiparasitic plant containing bioactive proteins with pharmaceutical applications in cancer treatment. In the realm of biotechnology, in vitro callus production serves as a crucial alternative for biomass production and medicinal compounds biosynthesis. Previous studies have shown that somaclonal variation in mistletoe callus cultures can lead to the production of new proteins.

In this context, protein content of *Viscum album* subsp. *abietis* tissues and biotechnologically propagated calluses, was analyzed to identify proteins with putative anticancer properties. Calluses were propagated from stem explants and protein extracts mass spectra were processed with Proteome Discoverer and a search was performed using as reference the Uniprot V. *album* reviewed database. Significant differences were noted in the protein content between calluses and the original plant tissues. Specifically, four mistletoe lectins, six viscotoxins, and the chitin-binding lectin-cbML were identified in the plant tissues. The process of callogenesis exhibited alterations in protein biosynthesis and the expression of novel protein isoforms. Mistletoe calluses were found to have a distinct protein biosynthetic profile compared to the donor plant tissues. Additionally, this study investigated the production of somaclonal proteins through mistletoe callus propagation and assessed their cytotoxic properties against breast and cervical cancer cell lines. The potential synergistic effects of these mistletoe protein extracts in combination with traditional chemotherapy (specifically, 5-FU) were also examined. The impact of the extracted proteins on HeLa cells was evaluated using the MTT proliferation assay, while oxidative damage and apoptosis induction were measured using sensitive methods such as carboxy-H₂-DCFDA, MitoSOX™ Red, and Caspase-3 activation assays. A cell-based biosensor was utilized to determine superoxide levels. The results indicated that protein extracts from mistletoe leaves and stems had a substantial effect on HeLa cells, promoting oxidative damage and inducing apoptosis, especially when combined with 5-Fluorouracil (5-FU). In contrast, callus extracts exhibited a mode of action similar to pure Mistletoe Lectin I (ML-I) and demonstrated different cytotoxic effects. Moreover, the cytotoxic effects of these protein extracts were tested on two breast cancer cell lines, the MCF-7 and the triple negative MDA-MB-231, revealing significant impact on cell proliferation, particularly when used in conjunction with 5-FU. These findings have the potential to uncover new bioactive products with pharmaceutical relevance and enhance our understanding of the biochemical pathways involving mistletoe proteins in cancer treatment.

Scientific area: Biotechnology

Key words: *Viscum album*, mistletoe, callogenesis, lectins, anticancer molecules, biosensor

Ευχαριστίες

Μια επιστημονική εργασία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από ένα άτομο, οπότε αισθάνομαι την ανάγκη να αναφερθώ και να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν και υποστήριξαν αυτή τη πορεία

Πρώτα από όλα τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σπύρο Κίντζιο, ο οποίος με εμπιστεύθηκε παρά την ηλικία μου, με καθοδήγησε, και με επέβλεπε καθημερινά. Ακόμα περισσότερο, μου εμπιστεύθηκε την συνέχεια μιας μελέτης που ξεκίνησε προσωπικά και συνεχίζει μέχρι σήμερα να επιβλέπει.

Τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ηλία Ηλιόπουλο και την Καθηγήτρια κ. Ελένη Ντούνη.

Τα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρικής Τεχνολογίας, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Γεωργία Μοσχοπούλου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Σοφία Μαυρίκου, με τις οποίες συνεργάστηκα στενά σε όλες τις εργασίες που δημοσιεύθηκαν κατά τη παρούσα διατριβή.

Στην πορεία αυτή αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη η συνεργασία με επιστήμονες από διαφορετικά πεδία και φορείς, και επιθυμώ να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Βλαχάκη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιερώνυμο Ζωιδάκη και την Ερευνήτρια Α κα Πηνελόπη Μπουζιώτη, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τους συνάδελφους υποψήφιους διδάκτορες Θεοφύλακτο Αποστόλου και Γεωργία Παϊβανά, και Μαρία-Αργυρώ Καραγεωργίου, την διδάκτορα κα Μαρία Μπαρμπεράκη, καθώς και τους φοιτητές του εργαστηρίου για την βοήθεια που μου προσέφεραν.

Απόλυτα καθοριστική υπήρξε η ηθική και όχι μόνο συμπαράσταση της οικογένειας μου, ανέχθηκαν πολλά τα τελευταία χρόνια αλλά πίστεψαν στο έργο με το οποίο είχα καταπιαστεί και δεν έφυγαν στιγμή από το πλευρό μου.

Σας ευχαριστώ όλους, ένα ειλικρινές ευχαριστώ δεν πρέπει μόνο να λέγεται αλλά και να γράφεται.

Βασίλης Δ. Τσεκούρας

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

Περιεχόμενα

Κατάλογος Συντημήσεων	i
1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του Ιξού.....	1
1.2. Φαρμακευτικά μόρια στον ιξό με εφαρμογές στην αντιμετώπιση του καρκίνου.....	3
1.2.1. Λεκτίνες.....	3
1.2.2. Βισκοτοξίνες και πολυπεπτίδια	5
1.2.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες	6
1.3. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη βιοσύνθεση και αξιολόγηση φαρμακευτικών πρωτεϊνών ιξού	7
1.3.1. Ιστοκαλλιέργεια ιξού	7
1.3.2. Αξιολόγηση φαρμακευτικών μορίων <i>in vitro</i>	9
1.4. Γυναικολογικοί καρκίνοι και ο ρόλος του ιξού.....	10
1.5. Απόπτωση	12
1.6. Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας 5-φθόριοουρακίλη και συνεργιστικές δράσεις με εκχυλίσματα ιξού.....	13
1.7. Κυτταρικός βιοαισθητήρας παρακολούθησης οξειδωτικού στρες.....	14
1.8. Σκοπός της μελέτης.....	17
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	19
2.1. Ιστοκαλλιέργεια ιξού	19
2.1.1. Φυτικό υλικό	19
2.1.2. Απολύμανση φυτικού υλικού	19
2.1.3. Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κάλων και παρασκευή του.	20
2.1.4. Ανάπτυξη και καλλιέργεια κάλων <i>in vitro</i>	21
2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών ιξού και παραλαβή πρωτεϊνικών κλασμάτων	22
2.2.1. Επιλογή φυτικής βιομάζας και ομογενοποίηση δειγμάτων για εκχύλιση πρωτεϊνών.	22
2.2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς Ιξού	23
2.2.3. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση θειικού αμμωνίου	24
2.2.4. Διαπίδυση πρωτεϊνών και παραλαβή πρωτεϊνικού κλάσματος	25
2.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	25
2.2.6. Ασυνεχή ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	27
2.2.7. Παρασκευή πηγματος για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	29
2.2.8. Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση	30

2.2.9.	Χρώση νιτρικού αργύρου (AgNO ₃).....	30
2.2.10.	Επιλογή σωμακλωνικών κάλλων	31
2.3.	Πρωτεομική ανάλυση ιστών ιξού	32
2.3.1.	Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς ιξού και προετοιμασία τους για πρωτεομική ανάλυση	33
2.3.2.	Φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με υγρό χρωματογράφο (LC-MS/MS).....	34
2.3.3.	Επεξεργασία των φασμάτων μάζας (MS)	35
2.4.	Καλλιέργεια και διατήρηση ζωικών κυτταρικών σειρών	35
2.4.1.	Καλλιέργεια κυττάρων.....	35
2.4.2.	Απόψυξη κυττάρων	36
2.4.3.	Ανακαλλιέργεια των κυττάρων.....	37
2.4.4.	Κρυσυντήρηση κυττάρων	37
2.4.5.	Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer.....	37
2.5.	Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT	39
2.6.	Εκχύλιση και μέτρηση ολικών πρωτεϊνών ζωικών κυττάρων	40
2.7.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3	41
2.8.	Φασματομετρικός προσδιορισμός επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS).....	43
2.8.1.	Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών ROS με τη χρωστική διοξική 2,7-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH-DA)	43
2.8.2.	Προσδιορισμός μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου με τη χρωστική MitoSOX™ Red	45
2.9.	Προσδιορισμός ανιόντος του σουπεροξειδίου με χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα.....	45
2.10.	Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιξού, λεκτίνη ML-I και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοριουρακίλη (5-FU) για βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές MCF7, MDA-MB-231 και HeLa.....	47
2.11.	Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	49
3.	Βιοτεχνολογική καλλιέργεια βιομάζας ιξού <i>in vitro</i> και συγκριτική μελέτη του πρωτεϊνικού περιεχομένου μητρικών ιστών και κάλων του φυτού.	50
3.1.	Ποσοστό καλογένεσης βλαστών ιξού και μορφολογικά χαρακτηριστικά των κάλων.....	52
3.2.	Ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων βλαστών, φύλλων και κάλων ιξού.	53
3.3.	Ταυτοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου βλαστών, φύλλων και κάλων ιξού και ανίχνευση αντικαρκινικών μοριών μέσω πρωτεομικής ανάλυσης.	55
3.4.	Συμπεράσματα και συζήτηση	57

4.	Αποτελέσματα επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, της λεκτίνης ML-1 και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοροουρακίλη, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους, σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa.....	60
4.1.	Εισαγωγή.....	60
4.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης των χειρισμών στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa με τη μέθοδο MTT.	62
4.2.1.	Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa.	62
4.2.2.	Επίδραση των εκχυλισμάτων ιξού στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa.	64
4.2.3.	Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa.	65
4.3.	Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά HeLa.....	69
4.4.	Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου στη κυτταρική σειρά HeLa.	71
4.5.	Επίδραση των χειρισμών στην ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3, στη κυτταρική σειρά HeLa.	74
4.6.	Εκτίμηση της επίδρασης των χειρισμών στη παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου με χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα.....	76
4.7.	Συμπεράσματα και συζήτηση.....	78
5.	Εκτίμηση της επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, της λεκτίνης ML-I, και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοροουρακίλη (5FU), μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους, σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 και MDA-MB-231.....	82
5.1.	Εισαγωγή.....	82
5.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης των χειρισμών στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231 τη μέθοδο MTT.	83
5.2.1.	Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7.	83
5.2.2.	Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231.	85
5.2.3.	Επίδραση των εκχυλισμάτων ιξού στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231.	87
5.2.4.	Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7.	89
5.2.5.	Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων MDA-MB-231.....	92
5.3.	Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στις κυτταρικές σειρές MCF7 και MDA-MB-231.....	96

5.3.1. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά MCF7.....	96
5.3.2. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά MDA-MB-231.....	99
5.4. Επίδραση των χειρισμών στην ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3 της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231.....	103
5.5. Συμπεράσματα και συζήτηση επίδρασης των χειρισμών στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231.....	106
6. Γενικά Συμπεράσματα και Συζήτηση.....	109
<i>Βιβλιογραφία</i>	111
<i>Παράρτημα</i>	128

Κατάλογος Συντμήσεων

<i>5-FU</i> (Fluorouracil)	5-φθοριουρακίλη
<i>Ac-DEVD-CHO</i>	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al
<i>Ac-DEVD-pNA</i>	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide
<i>AgNO₃</i> (Silver nitrate)	Νιτρικός άργυρος
<i>AmSO₄</i> (Ammonium Sulfate)	Θεικό αμμώνιο
<i>BAP</i> (6-Benzylaminopurine)	6-βενζυλαμινοπουρίνη
<i>BSA</i> (Bovine serum albumin)	Αλβουμίνη βόειου ορού
<i>CaCl₂</i> (Calcium chloride)	Χλωριούχο ασβέστιο
<i>CHAPS</i>	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
<i>DCF</i> (2,7-Dichlorofluorescein)	2,7-Διχλωροφλοουρεσίνη
<i>DMEM</i>	Dulbecco's modified Eagle medium
<i>DMSO</i> (Dimethyl sulfoxide)	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
<i>DOX</i> (doxorubicin)	Δοξορουβικίνη
<i>DTT</i> (Dithiothreitol)	Διθειοθρεϊτόλη
<i>FBS</i> (Fetal bovine serum)	Ορός εμβρύου μόσχου
<i>H₂DCFDA</i> (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate)	2,7 Διοξική διχλωρο-διυδροφλοουρεσκεΐνη
<i>H₂O₂</i> (Hydrogen peroxide)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
<i>HCl</i> (Hydrogen chloride)	Υδροχλώριο
<i>HEPES</i> (2-[4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid)	4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπερ-αζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
<i>HgCl₂</i> (Mercuric chloride)	Χλωριούχος υδράργυρος
<i>kDa</i>	Kilodaltons
<i>MLI, MLII, MLII</i> (Mistletoe lectins 1, -2, -3)	Λεκτίνες ιξού 1, -2, -3

<i>MS</i>	Θρεπτικό υπόστρωμα τύπου Murashige & Skoog
<i>MTT</i> [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-2H-tetrazolium bromide]	Βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο
<i>MW</i> (Molecular Weight)	Μοριακό βάρος
<i>MWCo</i> (Molecular Weight Cut-off)	Όριο μοριακού βάρους
<i>NAA</i> (1-Naphthaleneacetic acid)	α-Ναφθαλινοξικό οξύ
<i>NAC</i> (N-acetyl-L-cysteine)	N-ακετυλο-L-κυστεΐνη
<i>NaOH</i> (Sodium hydroxide)	Υπεροξείδιο του νατρίου
<i>PBS</i> (Phosphate-buffered saline)	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων
<i>pNA</i> (p-nitroaniline)	p-νιτροανιλίνη
<i>ROS</i> (Reactive Oxygen Species)	Ενεργές μορφές οξυγόνου
<i>SDS</i> (Sodium dodecyl sulfat)	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
<i>subsp</i> (subspecies)	υποείδη

1. Εισαγωγή

1.1. Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του Ιξού

Το γένος *Viscum* περιλαμβάνει περίπου 100 είδη, με τα περισσότερα από αυτά να εντοπίζονται στην Αφρική και την Μαδαγασκάρη, με έναν μικρότερο αριθμό να εμφανίζεται στη νότια Ασία. Το φυτό *Viscum album* L., γνωστό ως ιξός ή γκι, αποτελεί έναν δίοικο ημιπαρασιτικό θάμνο που αναπτύσσεται σε κλαδιά δένδρων που ανήκουν στα γένη *Prunus*, *Salix*, *Malus*, *Populus*, *Pinus*, *Sorbus*, *Abies*, *Crataegus* και *Acer* (Barney et al. 1998). Πρόκειται για είδος της τάξης Santalales των οικογενειών Loranthaceae και Santalaceae. Το γένος του φυτού είναι διαδεδομένο σε Ευρώπη, Αμερική, Ασία και Αφρική (Zuber 2004).

Με βάση την εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, ο ευρωπαϊκός ιξός διακρίνεται σε 4 υποείδη:

- *V. album* subsp. *album* L που παρασιτεί σε δικοτυλήδονα δέντρα
- *V. album* subsp. *abietis* που παρασιτεί σε *Abies* spp.
- *V. album* subsp. *austriacum* που παρασιτεί σε *Pinus* spp, *Larix* sp., *Picea* sp
- *V. album* subsp. *creticum* που παρασιτεί στο *Pinus halepensis* subsp. *Brutia*

Το *Viscum album* είναι ένας σφαιρικός αειθαλής πολυετής θάμνος που ζει ημιπαρασιτικά σε κλαδιά δέντρων. Η διάμετρος του μπορεί να φτάσει και τα 150cm με ένα μοτίβο διαξονικής διακλάδωσης. Τα φύλλα είναι αντίθετα, επιμήκη, δερματώδη και κιτρινοπράσινα, με μήκος που κυμαίνεται μεταξύ 2 με 8cm, στόματα εντοπίζονται και στις δύο πλευρές των φύλλων και έχουν πυκνότητα που ποικίλλει. Το μήκος των μεσογονάτιων διαστημάτων κυμαίνεται μεταξύ 1 και 9cm, ενώ το μέγεθος τους, καθώς και το μήκος των φύλλων, αυξάνεται στα πρώτα πέντε χρόνια μετά τη βλάστηση και ελαττώνεται αργά μετέπειτα. Τα άνθη είναι μικρά και δυσδιάκριτα, με τον χρωματισμό τους να είναι κιτρινοπράσινος. Επιπλέον, το *Viscum album* είναι δίοικο με τα αρσενικά άνθη να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα θηλυκά, αλλά και με τα δύο να διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν νέκταρ. Τέλος, ο καρπός που παράγει είναι κάψα, διαμέτρου 6 με 10mm, με λευκό, ή πιο περιστασιακά κίτρινο, περικάρπιο (Krasylenko et al. 2020).



Εικόνα 1-1. Φυτό *Viscum album* var *abietis* σε κλαδιά ελάτου.

Το *Viscum album* προσδέεται στο κλαδί του ξενιστή μέσω ενός πρωτογενούς *haustorium*, το οποίο αποτελεί ένα τροποποιημένο ριζίδιο. Κατά τη βλάστηση, η άκρη του ριζιδίου, με την επαφή του στην επιφάνεια του ξενιστή, αναπτύσσεται και σχηματίζει ένα δίσκο προσκόλλησης. Στη συνέχεια αναπτύσσεται ένα διατρητικό όργανο, το μέσω ενζυμικής δράσης διαπερνά την επιφάνεια του ξενιστή και εισέρχεται στο εσωτερικό του. Το όργανο διάτρησης φτάνει στα αγγεία του ξύλου και σχηματίζεται μια γέφυρα μεταξύ του ξενιστή και των βλαστών του ιξού για τη μεταφορά νερού και θρεπτικών (Mylo et al. 2021).

Ο ιξός είναι ημιπαράσιτο, απορροφά νερό και θρεπτικά από τον ξενιστή αλλά είναι εξ ολοκλήρου ή μερικώς ανεξάρτητο ως προς την παραγωγή άνθρακα καθώς διαθέτει χλωροφύλλη και είναι ικανό να φωτοσυνθέτει. Ο ρυθμός διαπνοής είναι υψηλός όπως στα περισσότερα παρασιτικά φυτά σε αντίθεση με τον ρυθμό φωτοσύνθεσης ο οποίος είναι αρκετά χαμηλός (Weber 1993a). Επίσης εμφανίζει φυσιολογικές διαφορές σε σχέση με τους ξενιστές, ειδικά στη λειτουργία των φύλλων, καθώς διαθέτει υψηλότερο ρυθμό διαπνοής, στοματικής αγωγιμότητας αλλά και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό. Ο υψηλός ρυθμός διαπνοής θεωρείται ότι αποτελεί μηχανισμό συσσώρευσης αζώτου αλλά και άλλων θρεπτικών στοιχείων (Schulze et al. 1984). Παρατηρούνται εποχιακές αλλαγές στη φυσιολογική δραστηριότητα του φυτού, που σχετίζονται με τους ρυθμούς ανάπτυξης. Την άνοιξη κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας και έκπτυξης των νεαρών βλαστών έχει την υψηλότερη φυσιολογική δραστηριότητα ενώ μια δεύτερη έντονη περίοδος φυσιολογικών παραμέτρων καταγράφεται το φθινόπωρο κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των καρπών (Baillon 1988). Οι φυσιολογικές λειτουργίες του ιξού

εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες που αναπτύσσεται. Σε *in vitro* καλλιέργειες κάλων ιξού, παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στη συσσώρευση μακροστοιχείων και μικροστοιχείων, ανάλογα με το φυτικό ιστό που χρησιμοποιήθηκε ως έκφυτο (βλαστός ή φύλλο) και τους ρυθμιστές ανάπτυξης που εφαρμοστήκαν στο θρεπτικό μέσο. Επίσης η συσσώρευση των θρεπτικών στοιχείων ήταν μεγαλύτερη στους κάλους από ότι στους μητρικούς βλαστούς και τους ξενιστές (Barberaki and Kintzios, 2002, Kintzios et al, 2003).

1.2. Φαρμακευτικά μόρια στον ιξό με εφαρμογές στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Τα είδη *Viscum* είναι υποχρεωτικά ημιπαράσιτα που αναπτύσσονται σε μια ποικιλία φυτών ξενιστών και παραδοσιακά θεωρούνται ως αποθήκες φαρμάκων (Patel and Panda 2014). Ειδικότερα στο *V. album*, έχουν εντοπιστεί πολλές κατηγορίες μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, κατά βάση γλυκοπρωτεΐνες, πολυπεπτίδια, φλαβονοειδή, τερπένια, αλκαλοειδή, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (Tsekouras and Kintzios 2020).

1.2.1. Λεκτίνες

Στον ιξό παράγονται τρεις γλυκοπρωτεΐνες, οι MLI, MLII και MLIII, που ταξινομούνται ως πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος τύπου 2 (2-RIPs λεκτίνες). Διαθέτουν εξειδίκευση ως προς την αναγνώριση και τη σύνδεση με γαλακτόζη και τη Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Πρόκειται για ισόμορφες πρωτεΐνες που σχηματίζονται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την Α-αλυσίδα και τη Β-αλυσίδα, που συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό [31] και επιδεικνύουν παραλλαγές όσον αφορά τη μοριακή μάζα και την ειδικότητα των υδατανθράκων [32-33]. Οι πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος προκαλούν την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης διασπώντας ένα συγκεκριμένο υπόλειμμα αδενίνης (A4324) από το 28S ριβοσωμικό RNA ([34]. Γενικά οι πρωτεΐνες τύπου 2-RIPs αποτελούνται από δύο πολυπεπτίδια, συνήθως συνδεδεμένα μέσω δισουλφιδικών δεσμών, και το κάθε τμήμα παρουσιάζει διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες. Η αλυσίδα Α είναι υπεύθυνη για την ενζυματική λειτουργία και η αλυσίδα Β διαθέτει συγκεκριμένες ιδιότητες δέσμησης υδατανθράκων ώστε το πρωτεϊνικό μόριο να μπορεί να αναγνωρίζει και να συνδέεται με τμήματα γαλακτόζης στην κυτταρική επιφάνεια [35]. Οι λεκτίνες του ιξού παρουσιάζουν δομικές διαφορές. Η ML-I έχει μοριακή βάρους 115 kDa, είναι μια ετεροδιμερή γλυκοπρωτεΐνη, ειδική ως προς την αναγνώριση της D-γαλακτόζης που αποτελείται από δύο υπομονάδες, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες. Κάθε υπομονάδα της λεκτίνης αποτελείται από δύο αλυσίδες, μια αλυσίδα Α μοριακού βάρους 29kDa και Β-αλυσίδα με μοριακό βάρος 34 kDa, με ειδικότητα ως προς τη γαλακτόζη. Η ML-II είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο αλυσίδες, μια αλυσίδα Α (27 kDa) και μια αλυσίδα Β (32 kDa) ειδική για τη Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Η MLIII έχει μια αλυσίδα Α (25 kDa) και μια αλυσίδα Β (30 kDa)

που δεσμεύεται τόσο με γαλακτόζη όσο και με N-ακετυλογαλακτοζαμίνη (Franz 1986, Tsekouras 2019).

Η τοξική επίδραση των λεκτινών προκύπτει από τη συνεργασία και των δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η αλυσίδα Β συνδέεται επιλεκτικά με υδατάνθρακες στην επιφάνεια των κυττάρων και στη συνέχεια, η κυτταροτοξική Α-αλυσίδα αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση (Endo et al. 1988). Η μεμονωμένη χορήγηση λεκτίνης ML-I του γκι στη κυτταρική σειρά T MOLT-4 (λευχαιμίας) προκάλεσε κυτταρικό θάνατο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ως αποτέλεσμα αποπτωτικών διεργασιών (Möckel et al. 1997). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν κατά την αγωγή με ML-I έναντι σε λέμφωμα κυττάρων Β και Τ, όπου η χορήγηση της πρωτεΐνης προκάλεσε την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, της κασπάσης-8 και της κασπάσης-9 (Bantel et al. 1999). Το εκχύλισμα ευρωπαϊκού γκι *Abnobaviscum F®*, από το δέντρο ξενιστή *Fraxinus*, προκάλεσε απόπτωση σε *in vitro* καλλιέργειες ανθρώπινης μυελογενούς λευχαιμίας K562, ανθρώπινου πλασματοκυτώματος RPMI-8226 και κυττάρων λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ποντικού L1210. Μια πιο λεπτομερής ανάλυση των κυττάρων K562, ανέδειξε την ύπαρξη πολλαπλών διεργασιών που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, όπως η ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού κασπάσης (κασπάση-9, JNK-1/2 και p38 MAPK), η φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης Β, η μείωση της κυτταρικής γλουταθειόνης και η αύξηση των επίπέδων ελευθέρων ριζών εντός του ενδοπλασματικού δικτύου (Park et al. 2012). Η λεκτίνη από κορεατικό ιξό (*V. album* subsp. *coloratum*) προκάλεσε απόπτωση σε κυτταρικές σειρές Hep3B ανθρώπινου ηπατικού αδενοκαρκινώματος SK-Hep-1 και ανθρώπινου ηπατώματος, ρυθμίζοντας τις διαδικασίες της κασπάσης 3 και την αναστολή της τελομεράσης (Lyu, Ho Choi, et al. 2002).

Οι λεκτίνες επιδεικνύουν αντικαρκινικές ιδιότητες μέσω διέγερσης ανοσολογικών αποκρίσεων (Elluru et al. 2006). Αυτό αποδίδεται στην επιλεκτική δέσμευση της αλυσίδας Β στην επιφάνεια των κυττάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κυτοκίνης και την ενεργοποίηση των φυσικών κυττάρων φονέων. Οι λεκτίνες του ιξού εφαρμόστηκαν με σκοπό την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι κακοηθειών και υγιών ατόμων (Hajto et al. 1997, Hajto et al. 1998, Klein, Classen, Berg, et al. 2002). Σε κλινικές δοκιμές με ασθενείς που διαγνώστηκαν με νόσο Hodgkin, πολλαπλό μύελωμα και καρκίνο του μαστού, όταν έλαβαν θεραπεία με το εκχύλισμα *Viscum album Qu* (*Quercus*), αυξήθηκαν αρκετές παράμετροι της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, όπως λευκοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και Τ-λεμφοκύτταρα (Gardin 2009). Σε μια άλλη μελέτη, οι ασθενείς με καρκίνωμα του μαστού εμφάνισαν σημαντική ενίσχυση των φυσικών φονέων και βοηθητικών Τ-κυττάρων μετά τη χορήγηση MLI (Beuth et al. 1995). Οι ασθενείς με γλοίωμα κατά τη χορήγηση σκευάσματος ιξού τυποποιημένου ως προς τη περιεκτικότητα σε λεκτίνες παράλληλα με τη τυπική θεραπεία, παρουσίασαν ενισχυμένες ανοσολογικές αντιδράσεις που βελτίωσε την ποιότητα ζωής τους (Lenartz et al. 1996). Η χορήγηση λεκτίνης ιξού επηρεάζει την ποιότητα ζωής του ασθενούς λόγω διέγερσης του

ανοσοποιητικού συστήματος, όπως καταδείχθηκε από άλλη κλινική δοκιμή σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν χημειοθεραπεία (Semiglasov et al. 2004). Λεκτίνη από το κορεάτικο γκι *V. album* subsp. *coloratum* χορηγήθηκε σε κύτταρα του ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου Caco-2, και προκάλεσε την αυξημένη έκφραση των κυτοκινών και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (Monira et al. 2009).

1.2.2. Βισκοτοξίνες και πολυπεπτίδια

Στον ιξό σχηματίζεται μια ομάδα τοξικών πρωτεϊνών που ονομάζονται βισκοτοξίνες. Είναι πολυπεπτίδια με χαμηλό μοριακό βάρος, περίπου 5 kDa, που αποτελούνται από 46 αμινοξέα συνδεδεμένα με τρεις δισουλφιδικές γέφυρες. Αυτά τα μόρια ταξινομούνται ως θειονίνες, μια ομάδα πρωτεϊνών με υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη Έχουν ανιχνευθεί και απομονωθεί έξι ισόμορφες, βισκοτοξίνες, οι A1, A2, A3, B, 1PS και UPS, από ιστούς *V. album* (Florack and Stiekema 1994, Urech et al. 2006). Οι βισκοτοξίνες αποτελούν βασικά εργαλεία του αμυντικού μηχανισμού των φυτών, και οι βιολογικές δραστηριότητες τους σχετίζονται με την πρόκληση τοξικότητας. Προκαλούν νέκρωση στα κύτταρα αλλά ενεργοποιούν και αποπτωτικούς μηχανισμούς καθώς διαθέτουν μια συγκεκριμένη θέση δέσμησης φωσφορικών που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας αλλοιώσεις (Schaller et al. 1998).

Εκχύλισμα *Viscum album* L. επέδειξαν κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι των κυττάρων σαρκώματος Yoshida, και η δράση τους σχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητά τους σε βισκοτοξίνες (Schaller et al. 1996). Δοκιμές με απομονωμένες ισομορφές βισκοτοξίνης εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση σε ανθρώπινα αδενοκαρκινικά κύτταρα τραχήλου μήτρας HeLa, και κύτταρα οξείας T λεμφοβλαστικής λευχαιμίας MOLT-4 (Kopora et al. 1980, Knörfli-Sidler et al. 2005). Επιπλέον, οι βισκοτοξίνες εμφάνισαν ανοσογονικές επιδράσεις πυροδοτώντας κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), την επαγωγή αντισωμάτων σε ασθενείς με όγκο και την ενεργοποίηση κοκκιοκυττάρων σε επικουρική θεραπεία καρκίνου (Tabiasco et al. 2002, Klein et al. 2002, Stein et al. 1999).

Πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους ανιχνεύθηκαν και απομονώθηκαν από το εκχύλισμα γκι Iscador από τον Kuttan (1988). Τα πεπτίδια Kuttan (kuttan's peptides) είναι θερμοσταθερά μόρια, μεγέθους περίπου 5kDa και παρουσίασαν κυτταροτοξικές ιδιότητες και μείωσης του όγκου, όταν χορηγήθηκαν σε ποντίκια με όγκο λεμφώματος Dalton. Σε άλλη μελέτη η θεραπεία με μεμονωμένα πεπτίδια παρουσίασε ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα, προκαλώντας την ενεργοποίηση μακροφάγων κυττάρων και φυσικούς φονείς NK, καθώς επίσης και κυτταροτοξικότητα, έναντι σε όγκο ινοβλάστη L-929 σε ανοσοκατεσταλμένους (Balb) ποντικούς (Kuttan and Kuttan 1992).

1.2.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες

Τα τερπένια είναι μια μεγάλη κατηγορία λιπόφιλων φυσικών ενώσεων που βρίσκονται σε φυτά, και συμμετέχουν σε αρκετές και διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες που εκτείνονται από δομικά υλικά των μεμβρανών έως περίπλοκες βιοχημικές διεργασίες. Τα τερπένια λειτουργούν ως ορμόνες, χρωστικές στη φωτοσύνθεση, φορείς ηλεκτρονίων, διαμεσολαβητές σύνθεσης πολυσακχαριτών, καθώς και ως μηχανισμοί επικοινωνίας και άμυνας. Αυτά τα μόρια παρουσιάζουν σημαντικές φαρμακολογικές επιδράσεις έναντι ασθενειών όπως καρκίνος, ελονοσία, φλεγμονές και μολυσματικές ασθένειες (Brahmkshatriya and Brahmkshatriya 2013, Wang et al. 2005).

Ο ιξός θεωρείται δεξαμενή υδρόφοβων τριτερπενικών οξέων, κατά βάση ολεανολικού, βετουλινικού και ουρσολικού οξέος, μόρια με σημαντική και τεκμηριωμένη αντικαρκινική δράση (Huang et al. 2012). Το Vicin είναι ένα λιπόφιλο εκχύλισμα γκι που παρουσίασε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και επαγωγή απόπτωσης έναντι των λευχαιμικών κυττάρων Molt4, K562 και U937. Το εκχύλισμα ήταν βιοδραστικό είτε σε απευθείας χορήγηση είτε όταν χορηγήθηκαν κλάσματα του αποτελούμενα από τριτερπένια (Urech et al. 2005). Τριτερπενικά εκχυλίσματα ιξού είχαν τοξική επίδραση σε κύτταρα μελανώματος ποντικού, προκαλώντας κατακερματισμό του DNA και απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης (Strüh et al. 2012). Επίσης, σέ μελέτη έναντι της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας προκλήθηκε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και δοσοεξαρτώμενη επαγωγή απόπτωσης, μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 8 και 9 (Delebinski et al. 2012). Υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα ιξού, εμπλουτισμένα με τριτερπενικά οξέα ανέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μεσολάβησαν στην επαγωγή αποπτωτικών μηχανισμών έναντι ραβδομυοσαρκώματος, ενώ η θεραπεία με μεμονωμένα εκχυλίσματα τριτερπενίων παρουσίασε μόνο αναστολή της αύξησης του όγκου (Stammer et al. 2017). Ο συνδυασμός ολεανικού οξέος και υδατικών εκχυλισμάτων γκι, προκάλεσε τοξικότητα σε ένα πάνελ κυτταρικών σειρών (THP-1, HL-60-, 143B- και Ewing TC-71) ενώ παράλληλα βελτίωσε την πρόσληψη της λεκτίνης ML-I από τα κύτταρα (Mulsow et al. 2016). Ενισχυμένη αυτοφαγική δραστηριότητα αναφέρθηκε όταν εκχυλίσματα τριτερπενίου, εγκλωβισμένα σε κυκλοδεξτρίνες, χορηγήθηκαν σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά σαρκώματος Ewing (Twardziok et al. 2017). Επιπλέον, λιπόφιλα εκχυλίσματα γκι διεγείραν το ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύοντας τη ρύθμιση της μετανάστευσης μονοκυττάρων και της έκφρασης κυτοκινών κατά τη συγκαλλιέργεια *in vitro* μακροφάγων με καρκινικές σειρές ανθρώπινου μαστού MCF-7 και HCC1143, αδενοκαρκινώματος παγκρέατος PA-TU-8902, καρκίνωμα προστάτη DU145, και καρκίνου του πνεύμονα NCI-H460 (Estko et al. 2015).

Στον ιξό περιέχονται και άλλα βιοενεργά μόρια με άντικαρκινικές ιδιότητες. Αλκαλοειδή που απομονώθηκαν από το φυτό και το εμπορικό εκχύλισμα Iscadog εμφάνισαν αντικαρκινικές ιδιότητες κατά των κυτταρικών σειρών λευχαιμίας *in vitro*, ακόμα και σε χαμηλή συγκέντρωση (16 µgr/ml) αλλά χρειάζονταν σχετικά υψηλές δόσεις (136 mg/kg) για να είναι αποτελεσματικά

έναντι σε ποντικια *Nude in vivo* [82]. Αλκοολικό εκχύλισμα με βάση το γκι, που αποτελείται κυρίως από φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, παρουσίασε αντιπολλαπλασιαστικά και αποπτωτικά αποτελέσματα κατά των καρκινικών κυττάρων μελανώματος ποντικού B16F10 και K562 [83]. Στο εκχύλισμα γκι *Helixor*, εντοπίστηκε και απομονώθηκε βιοδραστικός ολιγοσακχαρίτης που επηρεάζει την δράση κυττάρων φυσικών φονεών σε συγκαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων με μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος *in vitro* (Klett and Anderer 1989). Πολυσακχαρίτης ραμνογαλακτουρονάνης που εντοπίζεται στο εμπορικό εκχύλισμα *Iscador-M* αποτελεί σημαντικό παράγοντα ενίσχυσης της κυτταροτοξικότητας κυττάρων NK σε συγκαλλιέργειες με καρκινικά κύτταρα K562, αφού μια ομάδα γαλακτουρονικού οξέος συνδέεται με το καρκινικό κύτταρο και ένα υπόλειμμα ακετυλιωμένης ραμνόζης γεφυρώνεται στο κύτταρο NK, με αποτέλεσμα ενισχυμένη σύζευξη των NK με τα καρκινικά κύτταρα (Mueller and Anderer 1990)

1.3. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη βιοσύνθεση και αξιολόγηση φαρμακευτικών πρωτεϊνών ιξού

1.3.1. Ιστοκαλλιέργεια ιξού

Η βιοτεχνολογία μπορεί να προσφέρει σημαντική εναλλακτική μέθοδο παραγωγής φυτικής βιομάζας σε μικρό χρονικό διάστημα. Οι καλλιέργειες *in vitro* (ιστοκαλλιέργεια), αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της φυτικής βιοτεχνολογίας εφόσον επιτρέπουν τεχνητό έλεγχο πολλών παραμέτρων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τις μεταβολικές διεργασίες των καλλιεργούμενων ιστών. Η ιστοκαλλιέργεια είναι ο κατεξοχήν κλάδος της βιοτεχνολογίας ο οποίος σχετίζεται με την παραγωγή, τη βελτίωση και τη διατήρηση φυτών. Η παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων ουσιών μέσα από την ιστοκαλλιέργεια αποτελεί έναν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα επιστημονικό κλάδο με γοργή εξέλιξη κατά το διάστημα των τελευταίων ετών (Sharma et al. 2022, Kintzios 2008). Στην καλλιέργεια φυτών *in vitro* παραλαμβάνεται ένα τμήμα ιστού από ένα φυτό δότη, το οποίο καλείται έκφυτο και τοποθετείται σε ένα υπόστρωμα που περιέχει θρεπτικά συστατικά και ορμόνες ανάπτυξης. Τα φυτικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με το μέσο καλλιέργειας και αναπτύσσονται με κατεύθυνση που εξαρτάται από της συνθήκες καλλιέργειας. Ένα φυτικό κύτταρο, κάτω από ορισμένες συνθήκες, μπορεί να εισέλθει σε φάση αποδιαφοροποίησης, να χάσει δηλαδή τον εξειδικευμένο χαρακτήρα του και να μετατραπεί σε κύτταρο χωρίς συγκεκριμένη λειτουργία. Το σύνολο των φυτικών κυττάρων τα οποία έχουν αποδιαφοροποιηθεί σχηματίζουν μια μορφολογικά διακριτή μάζα, η οποία είναι γνωστή με το όνομα κάλος (*callus*). Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα του κάλου γενικά χαρακτηρίζονται από έντονη διαίρεση και κατά συνέπεια αυξάνονται πολύ γρήγορα (Ikeuchi et al. 2013).

Η παράγωγή μεταβολιτών και ειδικότερα αντικαρκινικών παραγόντων μπορεί να είναι ευνοϊκότερη σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας παρά *in vivo*. Φυτά που δύσκολα καλλιεργούνται ή υπάρχει μικρή διαθεσιμότητα τους στη φύση, μπορούν ευκολότερα να πολλαπλασιαστούν, να διατηρηθούν ή να σχηματιστούν κάλοι. Διαφοροποιώντας τις συνθήκες ιστοκαλλιέργειας ελέγχεται η ποσότητα, η σύνθεση και ο χρόνος παραγωγής μεταβολιτών. Με τη διαδικασία αυτή μπορούν να προσπελαστούν προβλήματα εποχικότητας ή αστάθειας της παραγωγής προϊόντων, σε σχέση με τα μητρικά φυτά. Η ηλικία, η εποχή ή το τμήμα από όπου προήλθε ο φυτικός ιστός (π.χ φύλλο ή βλαστός) επηρεάζουν το μεταβολικό του προφίλ, αλλά σε *in vitro* συνθήκες η παραγωγή των ιστών μπορεί να προσαρμοστεί στις επιθυμητές παραμέτρους. Επιπλέον τροφοδοτώντας τις *in vitro* καλλιέργειες με πρόδρομες ουσίες μπορεί να επιτευχθεί υψηλότερη βιοσύνθεση ορισμένων μεταβολιτών σε σχέση με ολόκληρα φυτά (Efferth 2019, Kakalis et al. 2023, Misyri et al. 2021). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ικανότητα σχηματισμού και παραγωγής νέων μορίων, μέσω βιομετατροπών ή λόγω σωμακλωνικής παραλλακτικότητας. Κατά την ιστοκαλλιέργεια, μπορεί να προκύψουν οργανισμοί που δεν είναι αντίγραφα των μητρικών, αλλά παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σωμακλωνική παραλλακτικότητα και αποτελεί μορφή προσαρμογής των φυτικών κυττάρων, στην ιστοκαλλιέργεια. Η κυτταρική ανάπτυξη και εξέλιξη *in vitro*, αποτελεί ένα δυναμικό σύστημα με πολλές παραμέτρους που το καθορίζουν μοριακές, γενετικές και επιγενετικές αλλαγές και παρατηρούνται μεταβολές, με προσωρινό ή μόνιμο χαρακτήρα, στο γονιδίωμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυτών και σχηματισμός νέων φαινότυπων (Duta-Cornescu et al. 2023).

Τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα ιξού χρησιμοποιούν ως αρχική ύλη βλαστικά τμήματα του φυτού που συγκομίζονται από το περιβάλλον, στο φυσικό ενδιαίτημα του είδους. Το φυτό είναι υποχρεωτικό ημιπαράσιτο και δεν υπάρχει δυνατότητα παραγωγής τους σε οργανωμένη φυτεία. Επίσης η περιεκτικότητα των ιστών του ιξού σε βιοδραστικά μόρια, και κατά συνέπεια και το εκχύλισμα του, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως ο ξενιστής που φύεται και η περίοδος συγκομιδής. Η πιθανότητα χρήσης καλλιέργειας κάλου ιξού ως πηγή αντικαρκινικών φαρμάκων αναφέρθηκε από τους Becker και Schwarz [85]. Ακολούθησε η πρώτη δοκιμή απομόνωσης πρωτοπλάστων [86], η πρόκληση κάλου από τα φύλλα του *V. album* subspp *Lutescens* καθώς και η ταυτοποίηση λεκτινών σε καλλιέργειες *in vitro* [87]. Μια πιο συστηματική προσέγγιση διεξήχθη από τους Kintzios και Barberaki [88] οι οποίοι διερεύνησαν την επίδραση ενός μεγάλου αριθμού δοκιμών από διάφορα τμήματα του φυτού, σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα και ρυθμιστές ανάπτυξης. Διερευνήθηκαν και πρόσθετοι παράγοντες όπως ο χρόνος συγκομιδής του φυτού (χειμώνας έναντι του καλοκαιριού) και τα πρωτόκολλα απολύμανσης των μοσχευμάτων. Οι κάλοι που παράχθηκαν ήταν βιοδραστικοί ενώ εντοπίστηκαν διαφοροποιημένοι, σωμακλωνικοί κάλοι ως προς το πρωτεϊνικό περιεχόμενο με αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές ιδιότητες σε φαιοχρωμοκύττωμα PC12 και κυτταροκαλλιέργειες μακροφάγων RAW 264.7 (Barberaki, Dermitzaki, N. Margioris, et al. 2015)

1.3.2. Αξιολόγηση φαρμακευτικών μορίων *in vitro*.

Η ανάπτυξη της χημείας, της βιολογίας καθώς και η κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν διάφορες ασθένειες οδήγησε σε σημαντική αύξηση των ενώσεων, που προβάλλουν ως υποψήφια βιοδραστικά προϊόντα με πιθανή φαρμακευτική δράση. Χρειάζονται δοκιμές που μπορούν γρήγορα και αξιόπιστα, να αξιολογούν την επίδραση μορίων και να δίνουν μια πρώιμη αξιολόγηση πιθανής φαρμακευτικής χρήσης. Κάθε υποψήφιο αντικαρκινικό φάρμακο υπόκειται σε προκαταρκτικούς προκλινικούς ελέγχους, για την επαλήθευση της δραστηριότητάς τους, τον έλεγχο του μηχανισμού δράσης, βιοχημικές επιπτώσεις και κυτταροτοξική συμπεριφορά. Καθορίζεται η δόση, ο χρόνος εφαρμογής, ο τρόπος διάθεσης και τυχόν παρενέργειες (Niu and Wang 2015).

Η χρήση μονοδιάστατων κυτταρικών σειρών είναι η πλέον συνηθισμένη για την μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης και αποκρίσεων σε χειρισμούς *in vitro* σε εργαστηριακό επίπεδο. Είναι μια γρήγορη και πλεονεκτική μέθοδος διότι επιτρέπει το μαζικό έλεγχο ενός μορίου σε διάφορες μορφές καρκίνου και την αξιολόγηση για περαιτέρω ανάπτυξη (Mirabelli et al. 2019). Οι δοκιμές σε κυτταρικές σειρές είναι ευρέως διαδεδομένες και εφαρμόζονται στη πλειοψηφία των προγραμμάτων ελέγχου ουσιών, στη φαρμακευτική βιομηχανία (Dumont et al. 2016). Ουσιαστικά είναι αθάνατα, καρκινικά κύτταρα, που παράγονται εύκολα, σε μεγάλο αριθμό και εφαρμόζονται συχνά σε δοκιμές μαζικού ελέγχου. Αντιπροσωπεύουν όλο το φάσμα νεοπλασιών και διαθέτουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα αρχικά καρκινικά κύτταρα. Δεν διαφοροποιούνται κατά την καλλιέργεια τους *in vitro* αλλά διατηρούν τις ίδιες μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές αποκλίσεις, επίπεδα μεθυλίωσης και έκφρασης mRNA (Wilding and Bodmer 2014).

Οι καρκινικές σειρές που χρησιμοποιούνται σε μελέτες βιοδραστικότητας φαρμάκων διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Οι πρωτογενείς κυτταρικές σειρές έχουν απομονωθεί από ζωντανούς ιστούς, και διατηρούν πολλά χαρακτηριστικά του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μελέτη της φυσιολογικής κυτταρικής συμπεριφοράς και των μηχανισμών ασθενειών (Richter et al. 2021). Οι προερχόμενες από όγκους καρκινικές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Επιτρέπουν στους μελετητές να παρατηρήσουν πώς τα φαρμακευτικά μόρια επηρεάζουν τα καρκινικά κύτταρα, βοηθώντας στην ανακάλυψη στοχευμένων θεραπειών. Υπάρχουν επίσης αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές που έχουν υποστεί γενετικές τροποποιήσεις, επιτρέποντάς τους να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον (de Bardet et al. 2023, Mirabelli et al. 2019).

Οι κυτταρικές σειρές χρησιμεύουν ως το πρώτο πεδίο δοκιμών για νέες φαρμακευτικές ενώσεις. Οι επιστήμονες εκθέτουν αυτά τα κύτταρα σε διάφορα μόρια για να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητά τους, επιτρέποντας τον εντοπισμό υποσχόμενων υποψηφίων φαρμάκων. Παράλληλα χρησιμοποιούνται για να εμβαθύνουν στους μηχανισμούς των ασθενειών σε κυτταρικό επίπεδο. Κατανοώντας τον τρόπο με τον οποίο τα φαρμακευτικά

μόρια αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα κύτταρα, αποσαφηνίζονται μεταβολικοί οδοί της νόσου, διευκολύνοντας τον στοχευμένο σχεδιασμό φαρμάκων (Gordon et al. 2018). Επίσης οι κυτταρικές σειρές βοηθούν στην αξιολόγηση πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών, διασφαλίζοντας ότι μόνο οι ασφαλέστερες ενώσεις προχωρούν σε δοκιμές σε ανθρώπους. προτού τα φάρμακα εισέλθουν σε κλινικές δοκιμές, υποβάλλονται σε αυστηρές αξιολογήσεις ασφάλειας. Με την πρόοδο της γονιδιωματικής έρευνας, κυτταρικές σειρές που προέρχονται από ιστούς ασθενών χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Αυτές οι σειρές βοηθούν στην προσαρμογή των θεραπειών σε μεμονωμένα γενετικά προφίλ, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Zhang and Dolan 2009, Durinikova et al. 2021). Πρέπει να επισημανθεί ότι ενώ οι κυτταρικές σειρές είναι χρήσιμες, έχουν περιορισμούς καθώς δεν αντιπροσωπεύουν πλήρως την πολυπλοκότητα των ανθρώπινων ιστών και οργάνων. Για το λόγο αυτό οι τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας, εξελίσσονται συνεχώς, εξερευνώντας τρισδιάστατες καλλιέργειες και οργανοειδή που μιμούνται καλύτερα τις συνθήκες *in vivo* (Balakrishnan et al. 2020, Fang and Eglen 2017).

1.4. Γυναικολογικοί καρκίνοι και ο ρόλος του ιξού.

Ο όρος καρκίνος ή κακοήθης νεοπλασία, μπορεί να οριστεί ως μια ασθένεια όπου μια ομάδα κυττάρων δεν ακολουθεί τους φυσιολογικούς ρυθμούς ελέγχου της αύξησης αλλά πολλαπλασιάζεται ασύστολα. Τα φυσιολογικά κύτταρα υπακούουν σε σήματα που υποδεικνύουν τη διαίρεση, διαφοροποίηση και το κυτταρικό θάνατο. Τα καρκινικά κύτταρα αυτονομούνται με αποτέλεσμα να επάγεται ανεξέλεγκτη αύξηση και πολλαπλασιασμός. Τα νεοπλασματικά κύτταρα των όγκων φέρουν επιπρόσθετα, μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά που τους δίνουν τη δυνατότητα διασποράς και μετάστασης σε άλλους ιστούς. Επιδρούν καταστροφικά στους ιστούς, στους οποίους εισβάλλουν σχηματίζοντας νέους όγκους και σε άλλα σημεία του σώματος (Hausman 2019)

Τα κύτταρα εξελίσσονται προοδευτικά σε μία νεοπλασματική κατάσταση και αποκτούν χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν την ικανότητα να γίνουν ογκογόνα και τελικά κακοήθη Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η διατήρηση της σηματοδότησης πολλαπλασιασμού των κυττάρων, η διαφυγή από σήματα καταστολής της ανάπτυξης, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, η ενεργοποίηση της πολλαπλασιαστικής αθανασίας των καρκινικών κυττάρων, η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης και η ενεργοποίηση της μετάστασης (Hannan and Bartsch 2018, Hanahan and Weinberg 2011). Η εκδήλωση του καρκίνου οφείλεται σε ενδογενείς παράγοντες όπως μεταλλάξεις, ορμονικά επίπεδα, κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και σε εξωγενείς όπως το κάπνισμα, έκθεση σε χημικά, ακτινοβολία ή παθογόνα. Η θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει χειρουργικές επεμβάσεις, ακτινοβολία, χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία βασίζεται στην συστηματική χορήγηση αντικαρκινικών

φαρμάκων που ταξιδεύουν σε όλο το σώμα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος του αίματος. Στην ουσία, αποτελεί τη χορήγηση δραστικών χημικών μορίων με στόχο να επαλειφθούν όλα τα καρκινικά κύτταρα μέσα στο σώμα των ασθενών, συμπεριλαμβανομένων και των μεταστατικών (Inoue et al. 2006, Anand et al. 2023). Ο καρκίνος επηρεάζει άτομα όλων των φύλων, αλλά ορισμένοι τύποι καρκίνου είναι πιο συχνοί στις γυναίκες, όπως ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας και της μήτρας. Οι γυναικολογικοί καρκίνοι είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία και αντιπροσωπεύουν περίπου το 10% όλων των καρκίνων που διαγιγνώσκονται στις γυναίκες. Ο καρκίνος του στήθους παραμένει όμως η πιο κοινή κακοήθεια στις γυναίκες και ευθύνεται για περισσότερο από το 20% των περιπτώσεων παγκοσμίως (Hailu et al. 2020).

Στην ανθρωποσοφική ιατρική, το γκι ξεχωρίζει ως ένα σημαντικό φυτικό φάρμακο με πολλά υποσχόμενες δυνατότητες στη θεραπεία του καρκίνου, ιδιαίτερα κατά του καρκίνου του μαστού, λόγω των ελάχιστων και μη απειλητικών για τη ζωή παρενεργειών του. Πολυάριθμες προκλινικές μελέτες *in vitro* και *in vivo* τεκμηριώνουν ότι εκχυλίσματα ιξού επάγουν αντικαρκινικές δράσεις κατά των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες αποδίδονται σε βιολογικά δραστικές ουσίες του, οι οποίες διαφέρουν κατά περίπτωση ανάλογα με τις γεωγραφικές περιοχές και τα δέντρα ξενιστές. Γενικά τα εκχυλίσματα συνιστάται για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλειά τους, με μόνη επιφύλαξη κάποιες περιπτώσεις αλλεργικών αντιδράσεων που έχουν επισημανθεί (Marvibaigi et al. 2014) Αντίστοιχα αποτελέσματα, δηλαδή παρατήρηση κυτταροτοξικής επίδρασης των εκχυλισμάτων και μεμονωμένων βιοδραστικών μορίων του ιξού, σε μια ποικιλία γυναικολογικών καρκινικών κυττάρων, των ωοθηκών, της μήτρας, του αιδοίου και του τραχήλου της μήτρας αναφέρονται σε μια συστηματική μελέτη από τους Kienle et al (2009)

Σε κλινικές μελέτες υπάρχουν ακαθόριστα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση παρασκευασμάτων ιξού σε τέτοιους καρκίνους, ως κύρια ή ως συμπληρωματική θεραπεία. Δεν αναφέρονται ενδοιασμοί ως προς την ασφάλεια εφαρμογής θεραπειών με ιξό, αλλά τα στοιχεία ως προς την αντικαρκινική δράση και τη βελτίωση της ζωής των ασθενών δεν είναι ισχυρά. Και συνίσταται παραπάνω έρευνα με υψηλότερο επίπεδο μεθοδολογίας, π.χ χορήγηση σκευασμάτων και από το στόμα, εφαρμογή τυφλού φαρμάκου κλπ (Steigenberger et al. 2023, Schnell-Inderst et al. 2022, Chen et al. 2022)

1.5. Απόπτωση

Ο σχηματισμός και η συντήρηση των πολυκύτταρων βιολογικών συστημάτων βασίζεται σε περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του οργανισμού. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, πολλά κύτταρα αναπτύσσονται σε πλεόνασμα, με αποτέλεσμα να υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, προς όφελος ολόκληρου του οργανισμού. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναφέρεται ως απόπτωση, και είναι μια θεμελιώδης βιολογική διαδικασία που παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών, της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε κανονικές φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται μηχανισμός που εξαλείφει τα κατεστραμμένα ή ανεπιθύμητα κύτταρα. Αυτή η ρυθμιστική διαδικασία περιλαμβάνει έναν καταρράκτη μοριακών γεγονότων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης ειδικών προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης και τον τελικό κατακερματισμό των κυτταρικών συστατικών (Elmore 2007, Gewies 2003). Σε ένα υγιές περιβάλλον, αυτή η διαδικασία αποτρέπει τη συσσώρευση δυνητικά καρκινικών κυττάρων. Ο καρκίνος, μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται στρατηγικές για να αποφύγουν την απόπτωση, επιτρέποντάς τους να ευδοκιμήσουν και να πολλαπλασιαστούν. Αυτοί οι μηχανισμοί διαφυγής μπορεί να περιλαμβάνουν ρύθμιση προς τα πάνω των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μεταλλάξεις σε προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες και αλλαγές στις οδούς αποπτωτικής σηματοδότησης (Fernald and Kurokawa 2013).

Η απόπτωση χρησιμεύει ως ένας ισχυρός αμυντικός μηχανισμός ενάντια στο σχηματισμό και την εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων αλλά τα κακοήθη κύτταρα μπορούν να χειραγωγήσουν και να ανατρέψουν την αποπτωτική διαδικασία προς όφελός τους, προάγοντας την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και την αντίστασή τους στη θεραπεία. Η κατανόηση της περίπλοκης ισορροπίας μεταξύ απόπτωσης και καρκίνου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών αντικαρκινικών θεραπειών. Οι θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν στο μονοπάτι της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα, ενώ διατηρούν τη λειτουργία της σε φυσιολογικά κύτταρα, υπόσχονται πολλά για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της θεραπείας του καρκίνου. Αυτή η συνεχιζόμενη έρευνα για την απόπτωση και τον καρκίνο αντιπροσωπεύει μια κρίσιμη οδό για την καταπολέμηση αυτής της καταστροφικής ασθένειας (Wong 2011). Η απόπτωση διακρίνεται στο εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης τα οποία ενεργοποιούνται από διαφορετικά σήματα και μηχανισμούς. Η ενδογενής απόπτωση, αναφέρεται και ως μιτοχονδριακή οδός, ενεργοποιείται από ενδοκυτταρικά σήματα (π.χ. αίσθηση ακτινοβολίας, υποξία, χημειοθεραπευτικά) που προέρχονται από το κύτταρο. Αποτελεί μια διαδικασία ελέγχου των κυττάρων για την εξάλειψη όσων παρουσιάζουν βλάβες στο DNA, κυτταρικό στρες ή άλλες φυσιολογικές παρεκκλίσεις. Τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικό σταθμός στη πρόκληση εγγενούς απόπτωσης, καθώς αποτελούν τη θέση αλληλεπίδρασης μεταξύ αντιαποπτωτικών

πρωτεϊνών (οικογένεια Bcl-2) και προαποπτωτικών πρωτεϊνών (πρωτεΐνες BAX και BAK), που ελέγχουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Μόλις απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c ενεργοποιεί την κασπάση-9, ενεργοποιώντας ένα καταρράκτη κασπασών, με αποκορύφωμα την ενεργοποίηση κασπασών εκτελεστών οι οποίες τελικά επιφέρουν την αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών και τον κυτταρικό θάνατο (Wang et al. 2016, Lossi 2022). Η εξωγενής απόπτωση, αναφέρεται και ως οδός υποδοχέα θανάτου, ενεργοποιείται από εξωκυτταρικά σήματα που προσλαμβάνουν υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας όπως ο Fas (CD95) και ο υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκου 1 (TNFR1) ενεργοποιούνται από τους αντίστοιχους συνδέτες τους όταν τα κύτταρα λαμβάνουν σήματα για απόπτωση. Η εμπλοκή των υποδοχέων θανάτου οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8, με αποτέλεσμα την σηματοδότηση του καταρράκτη κασπασών και το κυτταρικό θάνατο (Anson et al. 2021).

Εκτός από τους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, η απόπτωση παίζει επίσης ζωτικό ρόλο στην επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα που προσελκύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διευκολύνοντας την κάθαρσή τους. Η αποτυχία αυτών των μηχανισμών κάθαρσης μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον, όπου τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απομακρύνονται αποτελεσματικά. Αυτό προάγει την ανάπτυξη του όγκου, καθώς τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκμεταλλευτούν αυτές τις ανεπάρκειες για να αποφύγουν την ανοσολογική ανίχνευση (Ekert and Vaux 1997, Gadiyar et al. 2020).

1.6. Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας 5-φθόριοουρακίλη και συνεργιστικές δράσεις με εκχυλίσματα ιξού.

Η φθοριοουρακίλη (5-FU) είναι ένας ισχυρός χημειοθεραπευτικός παράγοντας της κατηγορίας των αντιμεταβολιτών που χρησιμοποιείται πάνω από 60 χρόνια και έχει γίνει ένα βασικό αντικαρκινικό φάρμακο, επιδεικνύοντας ευρεία αντικαρκινική δράση και συνέργεια με άλλα φάρμακα. Χορηγείται για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος κακοηθειών, όπως του γαστρικού αδενοκαρκινώματος, του αδενοκαρκίνου του παγκρέατος, του καρκινώματος του μαστού και του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. Η 5-FU εισέρχεται στα κύτταρα και μετατρέπεται σε τριφωσφορική φθοριοουριδίνη (FUTP), η οποία αντικαθιστά την τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) στο RNA. τριφωσφορική φθοριοδεοξουριδίνη (FdUTP), που υποκαθιστά την τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη (dTTP) στο DNA και σε μονοφωσφορική φθοριοδεοξουριδίνη (FdUMP), η οποία συνδέεται με τη θυμιδυλική συνθάση (TS), εμποδίζοντας την παραγωγή μονοφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης (dTMP), ζωτικής σημασίας για την αντιγραφή και την επισκευή του DNA. Η εξάντληση του dTMP οδηγεί σε ανισορροπία

νουκλεοτιδίων, προκαλώντας θραύσεις του δίκλωνου DNA μέσω της δράσης της ενδονουκλεάσης. Επιπλέον, η 5-FU, που δρα ως ανάλογο πυριμιδίνης, ενσωματώνεται λανθασμένα στο RNA και το DNA, διαταράσσοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και επάγοντας κυτταρικό θάνατο σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Η 5-FU επηρεάζει επίσης την επεξεργασία του RNA και ενισχύει την έκφραση του p53 (Casale and Patel 2023, Miura et al. 2010). Η 5-FU κατά τη χορήγηση του σε ασθενείς έχει πολύ μικρή βιοδιαθεσιμότητά τους λόγω της κακής διαπερατότητας της μεμβράνης και της απορρόφησης της από το γαστρεντερικό σύστημα. Για το λόγο αυτό προτείνεται ο εγκλωβισμός του σε φορείς ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα της 5-FU *in vitro* και *in vivo*, με συνέπεια να βελτιωθούν οι επιδράσεις του φαρμάκου (Ewert de Oliveira et al. 2021, Kevadiya et al. 2012). Σε *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων έχουν αναφερθεί εφαρμογές του χημειοθεραπευτικού παράγοντα για μεγάλο χρονικό διάστημα από 48 έως και 96 ώρες (Liao et al. 2023, Focaccetti et al. 2015).

Ο συνδυασμός του φαρμάκου με εκχυλίσματα ιξού έχει δοκιμαστεί σε κλινική μελέτη φάσης II που σχεδιάστηκε για να προσδιορίσει εάν το εκχύλισμα *Abnoba-viscum Quercus* μπορεί να προκαλέσει απόκριση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ανθεκτικός στη χημειοθεραπεία με βάση 5-φθοροουρακίλη και λευκοβορίνη (Bar-Sela and Haim 2004). Το ίδιο εμπορικό σκεύασμα αξιολογήθηκε ως προς την αποκρίση όγκου παράλληλα με χημειοακτινοθεραπεία σε καρκίνο του ορθού. Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επικουρική λήψη του εκχυλίσματος εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα (Baek et al. 2021). Διάφορα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα ιξού δοκιμάστηκαν σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη έναντι της βιωσιμότητας των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου IEC-6 και Caco-2, με σημαντικά κυτταροτοξικά αποτελέσματα. Τα εκχυλίσματα Ευρωπαϊκού ιξού Helixor A και Iscador M Spez χρησιμοποιήθηκαν επικουρικά στην χημειοθεραπεία με 5-FU σε ασθενείς με καρκίνο του στήθους σε κλινική μελέτη, βελτιώνοντας ορισμένες παρενέργειες της χημειοθεραπείας (Pelzer et al. 2018).

1.7. Κυτταρικός βιοαισθητήρας παρακολούθησης οξειδωτικού στρες.

Βιοαισθητήρας καλείται ένας σύστημα που μετατρέπει μια βιολογική αντίδραση σε ηλεκτρικό σήμα. Στόχος ενός βιοαισθητήρα είναι να ανιχνεύσει μια ουσία, με τη χρήση κάποιου υλικού βιολογικής προέλευσης π.χ. πρωτεΐνη. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιολογικών μορίων ανίχνευσης και της προς ανάλυση ουσίας (Bhalla et al. 2016). Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι εξειδικευμένες συσκευές που χρησιμοποιούν ως αισθητήρια στοιχεία ζωντανά κύτταρα σε συνδυασμό με αισθητήρες ή μεταγωγείς. Μπορούν να ανιχνεύσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του ερεθίσματος και των κυττάρων, και τα κύτταρα όχι μόνο αποδίδουν ποιοτική απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, αλλά βοηθούν επίσης και στην ποσοτική ανάλυση βιοεπιδράσεων

σε σύνθετα δείγματα. Αποτελούνται από δύο κύρια μέρη, το πρώτο είναι τα ζωντανά κύτταρα, που είναι ο κύριος μεταγωγέας και χρησιμοποιείται ως αρχικό στοιχείο πρόσληψης και αναμετάδοσης σημάτων. Το δεύτερο μέρος είναι οι δευτερεύοντες μεταγωγείς, που χρησιμοποιούνται στη μετατροπή των φυσιολογικών σημάτων σε ηλεκτρικά. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες είναι ευέλικτα συστήματα καθώς η σύνδεση μεταξύ διαφορετικών μηχανισμών μεταγωγής εξαρτάται συχνά από τους τύπους των κυττάρων που χρησιμοποιούνται ενώ έχουν το πλεονέκτημα της μεγάλης ταχύτητας απόκρισης, της φορητότητας και του χαμηλού κόστους (Gheorghiu 2020, Kintzios 2007).

Οι κυτταρικές μεμβράνες δεν αποτελούν άκαμπτες, παθητικές δομές που οριοθετούν την διεπαφή μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος αλλά έχουν ζωτική σημασία για τη λειτουργία των κυττάρων. Διασφαλίζουν τη κυτταρική επικοινωνία και τη μεταγωγή εξωτερικών ερεθισμάτων μέσω υποδοχέων που ενεργοποιούν σηματοδοτικά μόρια ενδοκυτταρικά. Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από διπλή στιβάδα λιπιδίων και πρωτεΐνες, που συγκροτούν μια διάταξη που επιτρέπει την επιλεκτική κίνηση ιόντων, μορίων και άλλων ουσιών (Escobar et al. 2020). Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης προκύπτουν από την παρουσία ιόντων και διαύλων ιόντων. Τα κανάλια ιόντων είναι εξειδικευμένες πρωτεϊνικές δομές ενσωματωμένες στην κυτταρική μεμβράνη που διευκολύνουν την κίνηση συγκεκριμένων ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης. Αυτά τα κανάλια μπορούν να ανοίγουν ή να κλείνουν ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως αλλαγές στην τάση ή τη δέσμευση με προσδότη. Το αποτέλεσμα της κίνησης διαφορετικών ιόντων στην πλασματική μεμβράνη συνεπάγεται τη παρουσία διαφορετικών ηλεκτροστατικών φορτίων σε όλη την κυτταρική μεμβράνη. Η διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης που προκύπτει από τη διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ των δύο πλευρών της διπλοστοιβάδας ορίζεται ως δυναμικό της μεμβράνης ενός κυττάρου. Η δυναμική αλληλεπίδραση ιόντων, καναλιών ιόντων και μεμβρανικού δυναμικού είναι θεμελιώδης για την καλή λειτουργία των κυττάρων και οι ηλεκτρικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης είναι απαραίτητες για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταγωγής σήματος, της μετάδοσης νευρικών παλμών, της συστολής των μυών και της ρύθμισης της μεταφοράς ιόντων και μορίων (Bakhtiari et al. 2023, Kulbacka et al. 2017).

Η μεμβρανική τροποποίηση αποτελεί σημαντικό βιοτεχνολογικό εργαλείο για να αλλάξουν οι ιδιότητες και λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη σύνθεση της μεμβράνης ή στην εισαγωγή εξειδικευμένων πρωτεϊνών που προσδίδουν νέες λειτουργίες στο κύτταρο. Τέτοιες διαδικασίες περιλαμβάνουν τεχνικές γενετικής τροποποίησης, όπου γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή συστατικά της μεμβράνης μεταβάλλονται ή εισάγονται στο κύτταρο, τεχνικές μηχανικής τροποποίησης της διπλοστοιβάδας λιπιδίων καθώς και τεχνικές ενσωμάτωσης μορίων στη δομή της μεμβράνης. Η μεμβρανική τροποποίηση επιτρέπει τη δημιουργία κυττάρων με επαυξημένες

δυνατότητες, όπως βελτιωμένη σταθερότητα, αυξημένη ευαισθησία σε συγκεκριμένα σήματα ή ακόμα και δυνατότητα εκτέλεσης νέων λειτουργιών (Saeui et al. 2015, Cheng et al. 2012).

Η Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) είναι ένα σύστημα βιοαισθητήρα που χρησιμοποιεί κύτταρα αιωρούμενα σε μια μήτρα γέλης για την ανίχνευση ηλεκτρικών αποκρίσεων. Προσδιορίζει την αντίδραση του κυττάρου σε διαφορετικούς συνδέτες, οι οποίοι είτε συνδέονται με το κύτταρο είτε επηρεάζουν τη φυσιολογία του. Η μέθοδος εφαρμόζεται για την ανίχνευση ιών (Kintzios et al. 2001), φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Apostolou et al. 2019), αφλατοξινών (Mavriku et al. 2017) καθώς και άλλων βιοενεργών μορίων, όπως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) (Moschoroulou et al. 2012). Επίσης με την μέθοδο μπορεί να ανιχνευθεί η παρουσία ανιόντος του σουπεροξειδίου στον εξωκυτταρικό χώρο γρήγορα, με μη επεμβατικό τρόπο, σε επίπεδο pH παρέχοντας πληροφορίες για το οξειδωτικό στρές που προκαλεί ένας χειρισμός (Moschoroulou and Kintzios 2006). Ο ηλεκτροφυσιολογικός βιοαισθητήρας ανίχνευσης σουπεροξειδίου, βασίζεται σε ακινητοποιημένα μεμβρανικά τροποποιημένα κύτταρα, που φέρουν το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) στη κυτταρική μεμβράνη. Πρόκειται για ένα σύστημα αισθητήρα που βασίζεται σε μεμβρανικά τροποποιημένα κύτταρα ινοβλάστη Vero, στα οποία έγινε ηλεκτροεισαγωγή του ενζύμου στην κυτταρική επιφάνεια, ώστε να λειτουργούν ως καταλυτικές μονάδες ικανές να μετατρέψουν το σουπεροξειδίο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η μεμβρανική τροποποίηση αποτελεί σημαντική βιοτεχνολογική προσέγγιση για την αύξηση της επιλεκτικότητας ενός κυτταρικού βιοαισθητήρα έναντι ενός μορίου στόχου, μετά την εισαγωγή υποδοχέων ειδικών για τον στόχο στην κυτταρική επιφάνεια. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου πυροδότησε αλλαγές στο δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης που μετρήθηκαν με κατάλληλα μικροηλεκτρόδια, σύμφωνα με την αρχή της ανάλυσης βιοηλεκτρικής αναγνώρισης BERA (Moschoroulou et al. 2011, Moschoroulou 2012). Η ηλεκτροεισαγωγή, είναι μια δυναμική τεχνική που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πρωτεϊνικών και άλλων μορίων σε κύτταρα θηλαστικών. Η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνεται προσωρινά με την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού και επιτρέπεται η εισαγωγή μορίων στα κύτταρα και την επιφάνεια της μεμβράνης τους (Gehl 2003).

Ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress) έχει οριστεί ως η διαταραχή στην ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, κυρίως ενεργών μορφών οξυγόνου, ROS και στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Οι αντιδράσεις μεταξύ των κυτταρικών συστατικών και των ελευθέρων ριζών οδηγούν σε καταστροφή των νουκλεϊκών οξέων, υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση των πρωτεϊνών, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποίηση ή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και το κυτταρικό θάνατο. Οι ROS προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο (O_2) με διαδοχικές αντιδράσεις αναγωγής, και είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-) (ή υπεροξειδικό ανιόν), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα του υδροξυλίου (OH^-) (Sies 2020).

Τα καρκινικά κύτταρα καταλαμβάνουν τους φυσιολογικούς μεταβολικούς μηχανισμούς παρεμβαίνοντας στα μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων, ώστε να διατηρηθεί η συνεχής κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός. Παρουσιάζουν έντονο μεταβολισμό, που προκαλεί άφθονη παραγωγή ελευθέρων ριζών, πολύ μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Τα υψηλά επίπεδα ROS που οφείλονται στην κακοήθεια σχετίζονται με προώθηση της ογκογένεσης καθώς μπορούν να προκαλέσουν αυξημένο πολλαπλασιασμό, σηματοδότηση επιβίωσης, γονιδιωματική αστάθεια και αυξημένη αγγειογένεση (Schieber and Chandel 2014). Κατά συνέπεια η μέτρηση των ROS, ειδικά σε πραγματικό χρόνο, είναι σημαντικός παράγοντας για την εκτίμηση της επίδρασης μιας ουσίας στο μεταβολισμό των κυττάρων.

1.8. Σκοπός της μελέτης

Η Βιοτεχνολογία είναι μια σύγχρονη επιστήμη που παρέχει αναλυτική ικανότητα και δυνατότητες παρέμβασης σε μοριακό επίπεδο. Αποτελεί ένα πεδίο όπου κυτταρικές, βιοχημικές, γενετικές, μικροβιολογικές και τεχνικές προσεγγίσεις συνδυάζονται για την ανάπτυξη εφαρμοσμένης έρευνας και τεχνολογικών εφαρμογών σε οργανισμούς .

Ένα από τα σημαντικότερα πεδία βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων είναι η ανακάλυψη, ανάπτυξη και εφαρμογή φαρμακευτικών προϊόντων . Μεγάλο τμήμα της έρευνας στοχεύει στο σχηματισμό μορίων, για την αντιμετώπιση της ασθένειας του καρκίνου. Αποτελεί μια πολύ σημαντική ασθένεια που προκαλεί εκατομμύρια θανάτους ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο. Προσβάλλει εξίσου τον ανδρικό και το γυναικείο πληθυσμό και αποτελεί το δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα θνησιμότητας μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Στις γυναίκες οι συχνότερες μορφές καρκινικών προσβολών αφορούν νεοπλασίες του στήθους και του αναπαραγωγικού συστήματος.

Η έρευνα πάνω σε φαρμακευτικά φυτά έχει σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη φαρμακευτικών μορίων, με αντινεοπλασματική δράση, τόσο για χημειοθεραπευτικές επεμβάσεις όσο και για επικουρική θεραπεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ιξός, ένα τοξικό, ημipαρασιτικό φυτό κωνοφόρων και άλλων δένδρων, με μακρά παράδοση σε ιατρικές εφαρμογές, που αποτελεί σημαντική πηγή βιοδραστικών μορίων ειδικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου (Zarkovic et al, 2001). Υπάρχουν διαθέσιμα φαρμακευτικά σκευάσματα από εκχυλίσματα Ιξού επεξεργασμένα με ζύμωση. Τέτοια είναι τα Israel, Cefaleksin, Lektinol, Eurixor, Iscador, Helixor, Iscucin, and Abnobaviscum58 (Giacometti, 2011). Τα κύρια φαρμακευτικά συστατικά του φυτού είναι τα πρωτεϊνικά μόρια λεκτίνες και βισκοτοξίνες. Επίσης περιέχονται σημαντικά τριτερπενοειδή, τερπένια, αλκάνια, αλκοόλες, флаβονοειδή, πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, πεπτίδια και πολυσακχαρίτες (Tsekouras and Kintzios 2020).

Μια νέα προσέγγιση αποτελεί η παραγωγή βιοδραστικών μορίων ιξού, με αντικαρκινική δράση μέσω κυτταροκαλλιέργειας Σωμακλωνικά παραγόμενες λεκτίνες Ιξού από κάλλους βλαστών του φυτού παρουσίασαν επιλεκτική και σημαντική κυτταροτοξική δράση σε καρκινικές σειρές, χωρίς να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα (Barberki et al, 2015). Στόχος της παρούσας διατριβής είναι να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό πρωτόκολλο σταθερής, ποιοτικά και ποσοτικά, παραγωγής των πρωτεϊνών Ιξού με τεχνικές ιστοκαλλιέργειας, δηλαδή παραγωγής μέσω κυτταρικών εργοστασίων. Με τον τρόπο αυτό θα διασφαλιστεί μια σταθερή βιολογική πηγή, ανεξάρτητη από εποχικές διακυμάνσεις ή άλλες παραμέτρους, όπου θα παράγονται οι πρωτεϊνικά εκχυλίσματα με άμεση αξιοποίηση στην κλινική χημειοθεραπεία.

Η *in vitro* αξιολόγηση βιομορίων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου, αποτελεί συνήθη διαδικασία της φαρμακευτικής έρευνας. Κάθε υποψήφιο αντικαρκινικό φάρμακο υπόκειται σε προκαταρκτικούς ελέγχους για τη διερεύνηση της δραστικότητας τους, τον έλεγχο του μηχανισμού δράσης, βιοχημικές επιπτώσεις και κυτταροτοξική συμπεριφορά. Σε δεύτερο στάδιο τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κάλλων αξιολογούνται σε σύγκριση με καθαρή λεκτίνη και αντίστοιχα εκχυλίσματα από το φυτό δότη, ως προς την αντιμετώπιση γυναικολογικών μορφών καρκίνου. Αποτελεί μια προσπάθεια πρωταρχικής μελέτης της πιθανής φαρμακευτικής χρήσης των βιομορίων, αξιολογώντας τη κυτταροτοξική συμπεριφορά τους και τις επιπτώσεις τους στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και κασπασών. Τα εκχυλίσματα χορηγούνται παράλληλα με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα 5-φθοριουρακίλη ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης τους κατά τη συμπληρωματική θεραπεία του καρκίνου.

Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ανεπτυγμένο μεταβολισμό, που προκαλεί άφθονη παραγωγή ελευθέρων ριζών, πολύ μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Τα υψηλά επίπεδα ROS προκαλούν περαιτέρω γενωμική αστάθεια και προώθηση της ογκογένεσης. Η ανάπτυξη βιοαισθητήρα για τη μέτρηση του σουπεροξειδίου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, αποτελεί μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα προσέγγιση της βιοχημικής επίδρασης των πρωτεϊνικών μορίων στα κύτταρα. Ο μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα καρκινικά κύτταρα συνδέεται άμεσα με τον επιθετικό μηχανισμό μετάστασης αλλά και την ανθεκτικότητα σε διάφορες χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις και το φαινόμενο αυτό είναι συχνό σε γυναικολογικούς καρκίνους (Vera-Ramirez et al., 2011). Με τη μέθοδο Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (BERA) είναι εφικτή η μέτρηση των επιπέδων σουπεροξειδίου σε πραγματικό χρόνο και με μη επεμβατικό τρόπο, παρέχοντας πληροφορίες για τις επιπτώσεις στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από θεραπευτικές προσεγγίσεις.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Ιστοκαλλιέργεια ιξού

2.1.1. Φυτικό υλικό

Επιλέχθηκαν φυτά ιξού (*Viscum album* subsp. *abietis*) που παρασιτούν σε κλαδιά Ελάτων (*Abies cephalonica*), στο όρος Πάρνηθα σε υψόμετρο άνω των 1000m (Εικ. 2-1). Η συγκομιδή της βλάστησης έγινε κατά τη χειμερινή περίοδο, το χρονικό διάστημα Δεκεμβρίου – Μαρτίου, κατά την οποία τα φυτικά τμήματα του ημιπαρασίτου είναι επιδεκτικά σε χειρισμούς καλογένεσης *in vitro* (Kintzios et al. 2002). Στο στάδιο αυτό, το φυτό δεν βρίσκεται σε ανθοφορία, διαθέτει χαρακτηριστικούς άσπρους καρπούς και εύκαμπτους νεαρούς βλαστούς έντονου πράσινου χρώματος. Τα τμήματα του φυτού που συγκομίστηκαν διατηρήθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα στους 4°C και ποσότητα φυτικού ιστού αποθηκεύτηκε στους -80 °C για περαιτέρω εφαρμογές. Για τις ανάγκες τις ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν μόνο νεαροί βλαστοί του τρέχοντος έτους.



Εικόνα 2-1: Φυτό ιξού που παρασιτεί σε βλαστούς ελάτου στη Πάρνηθα

2.1.2. Απολύμανση φυτικού υλικού

Οι βλαστοί ιξού ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό ώστε να απομακρυνθούν ακαθαρσίες και ξένες ύλες από την επιφάνειά τους. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν νεαροί βλαστοί με ψαλίδι, ώστε να παραληφθούν μόνο μεσογονάτια τμήματα και ακολούθησε δεύτερη πλύση με τρεχούμενο νερό. Η απολύμανση των εκφύτων πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο Κίντζιος (2002), δηλαδή οι βλαστοί μετά τις πλύσεις εμβαπτίστηκαν σε υδατικό διάλυμα 10% v/v υποχλωριώδους ασβεστίου, (CaOCl₂, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) για 15 λεπτά υπό

ανάδευση. Ακολουθως, πραγματοποιείται μεταφορά και εμφύσηση τους σε υδατικό διάλυμα 0,1% w/v χλωριούχου υδραργύρου ($HgCl_2$, Merck, Darmstadt, Germany) για 12 λεπτά, επίσης υπό ανάδευση. Τα δύο διαλύματα απολύμανσης περιέχουν την επιφανειοδραστική ουσία πολυαιθυλενο-γλυκολική μονολαουρική σορβιτάνη (Tween-20, Merck, Darmstadt, Germany) σε αναλογία 2% v/v. Ακολουθούν 4 εκπλύσεις με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό εντός του θαλάμου νηματικής ροής, σε ασηπτικές συνθήκες.

2.1.3. Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κάλων και παρασκευή του.

Η καλογένεση των βλαστών γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τον Kintzios (2002). Βασίζεται στο ευρέως διαδεδομένο υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας Murashige και Skoog (MS) (1962), ένα θρεπτικό διάλυμα ιδιαίτερα πλούσιο σε μακροστοιχεία, μικροστοιχεία, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Το βασικό υπόστρωμα MS εμπλουτίζεται με τους φυτορρυθμιστικούς παράγοντες, α -Ναφθαλινοξέοιο οξύ (NAA, Serva, Heidelberg, Germany) (4,95 μM) και 6-Βενζυλαμινοπουρίνη (BAP, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) (2,82 μM) που δρουν ως ρυθμιστές προώθησης σχηματισμού κάλων. Η προστασία των εκφύτων και των κάλων από οξειδωτικούς παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν κασάνωση ή νέκρωση των ιστών, επιτυγχάνεται με την προσθήκη ασκορβικού οξέος (Ferak, Berlin, Germany) σε συγκέντρωση 10 mg/L. Επιπλέον, προστίθενται σάκχαρα ως πηγές οργανικών ουσιών και ενέργειας, 3% σουκρόζη (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) και 0,1% μυο- ινοσιτόλη (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 5,8 με τη χρήση αραιών βάσεων και οξέων, 1 N υδροξείδιο του νατρίου (NaOH, Merck, Darmstadt, Germany) ή 1 N υδροχλωρικού οξέος (HCl, Scharlau, Barcelona, Spain). Η στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου γίνεται με την προσθήκη 0,8% άγαρ. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C, σε πίεση 1,2 ατμόσφαιρες, για 20 λεπτά, και ακολουθεί η έγχυση του σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm εντός του θαλάμου νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Πίνακας 2-1: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige and Skoog 1962)

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ MS

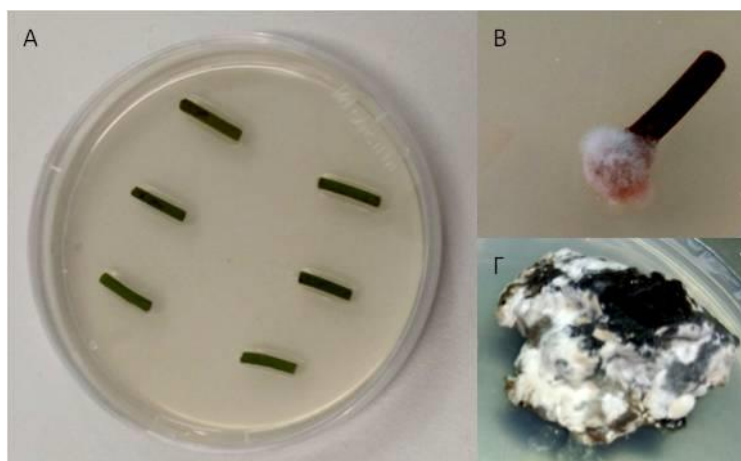
Συστατικά	Συγκέντρωση (mg/L)
KNO_3	1.900
NH_4NO_3	1.650
$CaCl_2$	440
$MgSO_4$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
Na_2EDTA	37,25
$FeSO_4$	27,8
KI	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
$C_6H_5NO_2$	0,5
$C_8H_{12}ClNO_3$	0,5
$C_{12}H_{17}N_4OS^+$	0,1
Γλυκίνη	2

2.1.4. Ανάπτυξη και καλλιέργεια κάλων *in vitro*.

Μετά την απολύμανση των βλαστών ακολουθεί κοπή και απομάκρυνση των ακραίων τμημάτων τους, καθώς η απολύμανση ενδέχεται να έχει προκαλέσει νέκρωση των εκτεθειμένων τμημάτων των ιστών. Στη συνέχεια τεμαχίζονται σε μικρότερα τμήματα, τελικού μήκους περίπου 1 cm., τα οποία εμφυτεύονται σε τρυβλία Petri που περιέχουν στερεοποιημένο το κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται 5 έκφυτα και η περιφέρεια τους σφραγίζεται με

Parafilm. Μετά την διαδικασία εμφύτευσης, τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο ανάπτυξης και επωάζονται σε θερμοκρασία 25 °C, σε φωτοπερίοδο 16/8, με τη χρήση φθορίζουσών λαμπών ψυχρού λευκού φωτός με ένταση φωτισμού 50 μmol.m-2s-1. Τα έκφυτα παρακολουθούνται κάθε 2-3 ημέρες για τον την ανάπτυξη μολύνσεων, οπότε απορρίπτονται από το θάλαμο ανάπτυξης, ή τον σχηματισμό κάλων.

Όταν εντοπίζεται καλογένεση σε ένα έκφυτο, μεταφέρεται το συντομότερο σε νέο τρυβλίο με φρέσκο υπόστρωμα, ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξη του κάλλου και να περιοριστεί το ενδεχόμενο μολύνσεων. Οι ώριμοι κάλοι, με ηλικία μεγαλύτερη των 2 μηνών, ενδέχεται να έχουν φθάσει σε μεγάλο μέγεθος οπότε συχνά διχοτομούνται κατά την υποκαλλιέργεια. Κάθε είκοσι ημέρες γίνονται τακτικές υποκαλλιέργειες, οι κάλοι μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο με φρέσκο υπόστρωμα, αν είναι αναγκαίο τεμαχίζονται σε μικρότερα τμήματα, και αναπτύσσονται υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτοπεριόδου και έντασης φωτισμού.



Εικόνα 2-2: Ιστοκαλλιέργεια βλαστών ιξού (Α). Ανάπτυξη νεαρού κάλου σε έκφυτο βλαστού (Β). Όριμος κάλος ηλικίας 4 μηνών (Γ).

2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών ιξού και παραλαβή πρωτεϊνικών κλασμάτων

2.2.1. Επιλογή φυτικής βιομάζας και ομογενοποίηση δειγμάτων για εκχύλιση πρωτεϊνών.

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων είναι βλαστοί και φύλλα ιξού, που συλλέχτηκαν τη διάρκεια του χειμώνα και είχαν διατηρηθεί στην κατάψυξη, καθώς και κάλοι που προέρχονται από την ιστοκαλλιέργειά βλαστών, των ίδιων μητρικών φυτών.

Η διαδικασία παραλαβής υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς ξεκινά από την απελευθέρωση τους από τα φυτικά κύτταρα. Είναι ένα κρίσιμο στάδιο, καθώς τα φυτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται στο εξωτερικό τους από την ύπαρξη κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα σύμπλεγμα πολυσακχαριτών και άλλων ενώσεων που είναι δύσκολο να διαρραγούν. Επομένως, η δυνατότητα απομόνωσης υποκυτταρικών υλικών καθορίζεται από το βαθμό ομογενοποίησης των αρχικών ιστών και διάσπασης των κυτταρικών μεμβρανών (Wang et al. 2008). Η μηχανική

λειτουργία στερεών δειγμάτων με γουδί και γουδοχέρι, παρουσία υγρού αζώτου, είναι μια συνήθη τεχνική που εξασφαλίζει την κατάλληλη προετοιμασία των ιστών για εκχύλιση πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας την πλήρη ομογενοποίηση τους σε λεπτή σκόνη και τη γρήγορη απομάκρυνση του νερού από τα κύτταρα. Επιπλέον, η παρουσία υγρού αζώτου κατά την μηχανική επεξεργασία των δειγμάτων διασφαλίζει ότι θα κατασταλούν τυχόν ενζυμικές αντιδράσεις και θα μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης μικροοργανισμών. Οι φυτικοί ιστοί χαρακτηρίζονται από σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και τη παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεάσες), που βρίσκονται σε διαφορετικά διαμερίσματα εντός του κυττάρου. Κατά τη κυτταρική λύση, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενδέχεται να έρθουν σε επαφή με πρωτεάσες, με αποτέλεσμα να προκληθούν ενζυμικές αντιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητη πρωτεόλυση που επιφέρει τροποποιήσεις στη πρωτεϊνική δομή με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται η βιολογική τους δράση. Οι χαμηλές θερμοκρασίες που προκαλεί το υγρό άζωτο αδρανοποιούν τη δράση των ενζύμων με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η μετουσίωση των πρωτεϊνών (Plaxton 2019, Shewry and Fido 1996, Wu et al. 2014).

2.2.2. Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς Ιξού

Οι ομογενοποιημένοι φυτικοί ιστοί υποβάλλονται σε εκχύλιση με κατάλληλο υδατικό διάλυμα ώστε να παραλειφθούν οι πρωτεΐνες στην υδατική φάση και να απομακρυνθούν τα κυτταρικά κατάλοιπα. Οι πρωτεΐνες όταν βρεθούν έξω από το φυσικό τους περιβάλλον ενδέχεται να υποστούν μεταβολές στη δομή του, να συσσωματωθούν ή να καθιζάνουν, ανάλογα με τις βιοχημικές ιδιότητες τους. Ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να εξασφαλίζει τις κατάλληλες συνθήκες εκχύλισης, που να ευνοούν τόσο την ανάκτηση των πρωτεϊνών όσο και να διασφαλίζει τη σταθερότητα τους, διατηρώντας το pH σε επιθυμητή τιμή, ρυθμίζοντας την ιοντική ισορροπία για να επιτευχθεί η διαλυτότητα του προϊόντος και περιέχοντας ουσίες για την πρόληψη ανεπιθύμητων τροποποιήσεων (Buyel et al. 2015, Andrés-Colás and Van Der Straeten 2017).

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA, pH 8.5 που αποτελείται από 50 mM Tris (Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands), 0.01 mM Na₂EDTA (BDH Biochemicals, Poole, UK), 5% (o/o) γλυκερόλη (Panreac Química, Barcelona, Spain), 20.5 mM χλωριούχο νάτριο (NaCl, Merck, Darmstadt, Germany), 100 mM (β/o) λακτόζη (D(+)-Lactose monohydrate, Berlin, Germany) και 2% (o/o) β-μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol, Fluka, Buchs, Switzerland), όπως προτείνεται από τη Barberaki (2015). Το διάλυμα αυτό είναι ρυθμιστικό και διατηρεί σταθερό το pH, ενώ περιέχει NaCl ώστε να διασφαλίζεται η διαλυτότητα των πρωτεϊνών (Hu et al. 2017). Η γλυκερόλη αποτρέπει την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών παρεμποδίζοντας την αποδιάταξη της δομής τους στο υδατικό περιβάλλον (Vagenende et al. 2009), ο χηλικός παράγοντας Na₂EDTA έχει προστατευτική δράση έναντι σε δισθενή κατιόντα και πρωτεάσες (Grabski 2009), ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη έχει το

ρόλο αναγωγικού παράγοντα παρεμποδίζοντας τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνικών υπολοίπων (Wingfield 2001b, Chang 1997). Η λακτόζη συνίσταται να προστίθεται στο διάλυμα εκχύλισης, για την αποφυγή δέσμευσης των λεκτινών του ιξού σε υδατανθρακικά συστατικά των ιστών (Olsnes et al. 1982).

Η διαδικασία εκχύλισης είναι η ακόλουθη. Αρχικά, αναμειγνύονται ποσότητες κάθε δείγματος και διαλύματος, σε αναλογία 1:10, δηλαδή σε 1 gr λειοτριβημένου ιστού προστίθενται 10 mL Tris-EDTA. Η εκχύλιση πραγματοποιείται υπό ανάδευση, με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, στους 4 °C μέχρι την επόμενη ημέρα, όπου τα στερεά υπολείμματα απομακρύνονται έπειτα από διήθηση με cheesecloth. Ακολουθεί διπλή φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος κάθε δείγματος σε ταχύτητα 5000xg, στους 4o βαθμούς για 15 min λεπτά, και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες το οποίο διατηρείται στους -80°C. Σε όλα τα στάδια προετοιμασίας των δειγμάτων και εκχύλισης των πρωτεϊνών, οι χειρισμοί έγιναν σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C) ώστε να προστατευθούν οι πρωτεΐνες από τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων.

2.2.3. Κατακρήμιση πρωτεϊνών με τη χρήση θειικού αμμωνίου

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε ένα υδατικό διάλυμα, αυξάνει με τη προσθήκη άλατος σε αυτό, εάν η τελική συγκέντρωση του είναι μικρότερη από 0.15M. Όταν προστίθεται περισσότερο αλάτι στο διάλυμα, αυξάνεται η επιφανειακή τάση του νερού ευνοώντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων περιοχών των επιφανειών των μορίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να μειώνουν την επιφάνεια τους, ώστε να ελαχιστοποιήσουν την επαφή τους με τον διαλύτη. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών ευνοεί την συσσωμάτωση και καταβύθιση τους, ενώ κάθε πρωτεΐνη κατακρημνίζεται σε διαφορετική συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα ανάλογα με τις βιοχημικές ιδιότητες της και περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH και η θερμοκρασία (Wingfield 2001a).

Το θειικό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄, AmSO₄) είναι ένα αλάτι που χρησιμοποιείται πολύ συχνά για τη κατακρήμιση πρωτεϊνών καθώς είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτό, δημιουργεί υψηλή ιοντική ισχύ και κυρίως σταθεροποιεί την πρωτεϊνική δομή επιτρέποντας τη διατήρηση της λειτουργικότητάς τους (Duong-Ly and Gabelli 2014). Η εξαλάτωση των πρωτεϊνών από τα εκχυλίσματα ιστών ιξού έγινε με τη χρήση θειικού αμμωνίου σε κορεσμό 80% (Mavrikou et al. 2020). Κάθε εκχύλισμα που είχε παραληφθεί, ογκομετρήθηκε και στη συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα του AmSO₄ (Merck, Darmstadt, Germany) που απαιτείται ώστε να επιτευχθεί κορεσμός 80% σε θερμοκρασία 4 °C, σύμφωνα με τον πίνακα κορεσμού διαλυμάτων (παράρτημα, Πίνακας 1). Το θειικό αμμώνιο προστίθεται σταδιακά, αφού έχει διαλυθεί η προηγούμενη ποσότητα, υπό ήπια και συνεχή ανάδευση του διαλύματος, το οποίο διατηρείται στους 4 °C. Η διαδικασία κατακρήμισης διαρκεί για όλη τη νύχτα και ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος σε ταχύτητα 5000xg, για 30 λεπτά, στους 4 °C, όπου παραλαμβάνεται το κατακρήμισμα. Στο ίζημα προστίθεται μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος φωσφορικών

αλάτων (PBS) 50 mM, έως ότου διαλυθεί πλήρως, και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση στερεών υπολειμμάτων. Το διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) που χρησιμοποιείται είναι κατάλληλο για βιοδοκιμές και αποτελείται από 0.13M χλωριούχο νάτριο (NaCl), 15.6 mM φωσφορικό μονοποτάσιο (KH_2PO_4 , Fischer Scientific, New Hampshire, United States) και 5 mM δεκαένυδρο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Riedel-de-Haen, Seelze, Germany). Το υπερκείμενο που παραλαμβάνεται μετά τη φυγοκέντρηση περιέχει ποσότητα άλατος. Το διάλυμα υπόκειται σε διαδικασία διαπίδυσης ώστε να απομακρυνθεί το άλας και να παραμείνουν μόνο οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες.

2.2.4. Διαπίδυση πρωτεϊνών και παραλαβή πρωτεϊνικού κλάσματος

Η διαπίδυση (ή διάλυση) αποτελεί μία ευρέως εφαρμοζόμενη εργαστηριακή τεχνική καθαρισμού των πρωτεϊνών που στοχεύει στην απομάκρυνση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους με τη χρήση εκλεκτικά διαπερατών μεμβρανών. Άλατα ή πρωτεΐνες μικρού μεγέθους μπορούν να απομακρυνθούν από ένα διάλυμα μέσω παθητικής διάχυσης, με τη χρήση ημιπερατής μεμβράνης με κατάλληλους πόρους. Το δείγμα τοποθετείται στη μεμβράνη και αναδεύεται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και οι πόροι της μεμβράνης επιτρέπουν τη διάχυση μορίων με μέγεθος μικρότερο από εκείνο των πόρων. Οι ενώσεις μικρού μεγέθους απομακρύνονται σταδιακά από το δείγμα και διατηρούνται οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες (Andrew et al. 2002).

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παρελήφθησαν μετά τη διαδικασία της εξαλάτωσης περιέχουν ποσότητα θειικού αμμωνίου και πρωτεΐνες διαφορετικού μοριακού βάρους. Η διαπίδυση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του άλατος καθώς και πρωτεϊνών με μέγεθος μικρότερο από 14 kDa. Χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες σελλουλόζης (MWCo = 14 kDa, Sigma, St. Louis, U.S.) που επιτρέπουν τη περατότητα πρωτεϊνών με μέγεθος μικρότερο από 14 kDa, ώστε να απομακρυνθούν από τα εκχυλίσματα οι βισκοτοξίνες, μια πρωτεϊνική ομάδα του ιξού με μέγεθος 5 kDa, που παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση. Πριν την έναρξη της διαπίδυσης, οι μεμβράνες ενυδατώνονται με 50 mM PBS, ύστερα προστίθενται στο εσωτερικό τους ποσότητα (χ) από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και τοποθετούνται σε γυάλινο δοχείο που περιέχει κατάλληλο όγκο, 2000 φορές μεγαλύτερο ($2000 \cdot \chi$) από εκείνο του δείγματος, υδατικού διαλύματος PBS 50 mM. Το πρωτεϊνικό διάλυμα διατηρείται υπό ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι την επόμενη ημέρα (Mavrikou et al. 2020). Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας παραλαμβάνεται εκχύλισμα που περιλαμβάνει βιοδραστικές πρωτεΐνες ιξού με μέγεθος μεγαλύτερο από 14 kDa, το οποίο διατηρείται στους -80 °C.

2.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford (1976) αποτελεί μία χρωματογραφική μέθοδο που εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών ενός δείγματος και βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue (G250), σε μόρια πρωτεϊνών ενός δείγματος. Σε όξινο

περιβάλλον υπερισχύουν τρεις μορφές ιόντων της χρωστικής, η κόκκινη, η πράσινη και η μπλέ. Η πιο ανιονική μορφή της χρωστικής είναι η μπλε, η οποία προσδένεται ισχυρά στις πρωτεΐνες και οδηγεί σε μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Για τον υπολογισμό μικρών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών σε διαλύματα (1-10 µg) έχει αναπτυχθεί η Bradford microassay (Brogdon and Dickinson 1983), και οι μετρήσεις γίνονται με τη χρήση πλακιδίων μικροτιτλοδότησης ELISA.

Το διάλυμα της χρωστικής παρασκευάζεται με τη προσθήκη 100 mgr Coomassie Blue G-250 (TCI, Tokyo, Japan) σε 50 ml 95% αιθανόλης (EtOH, Chem-Lab, Zedelgem, Belgium). Στο μίγμα προστίθενται υπό συνεχή ανάδευση 100 ml 85 % (w/v) φωσφορικό οξύ (Phosphoric acid, Chem-Lab, Zedelgem, Belgium) και ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 1 lt, με τη προσθήκη ddH₂O. Στη συνέχεια παρασκευάζεται πρότυπη καμπύλη απορρόφησης, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης βόειου ορού (BSA, Pan Biotech, Aidenbach, Germany) από 0.05-1 mg/mL. Σε ένα πλακίδιο μικροτιτλοδότησης ELISA των 96 φρεατίων (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) τοποθετούνται 10 µL ανά φρεάτιο, από κάθε συγκέντρωση διαλύματος BSA ή άγνωστου δείγματος, και προστίθενται 190 µL διαλύματος εργασίας Bradford. Ως μάρτυρας, για τη πρότυπη καμπύλη και για τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιείται αντίστοιχη ποσότητα του διαλύτη 50 mM PBS. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιείται κατάλληλος αριθμός επαναλήψεων, όπου επωάζονται για 5 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm σε Φωτόμετρο (Tecan Infinite M220 Pro, TECAN, Männedorf, Switzerland). Με βάση τις μετρήσεις παρασκευάζεται καμπύλη απορρόφησης από τις διαφορετικές γνωστές συγκεντρώσεις BSA και προκύπτει η εξίσωση της καμπύλης τύπου $Y=ax + b$, από την οποία εκτιμάται η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα σε ισοδύναμη συγκέντρωση BSA.



Εικόνα 2-3. Μέθοδος Bradford σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης ELISA 96 φρεατίων. Παρατηρείται διακύμανση χρώματος ανάλογα την πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων.

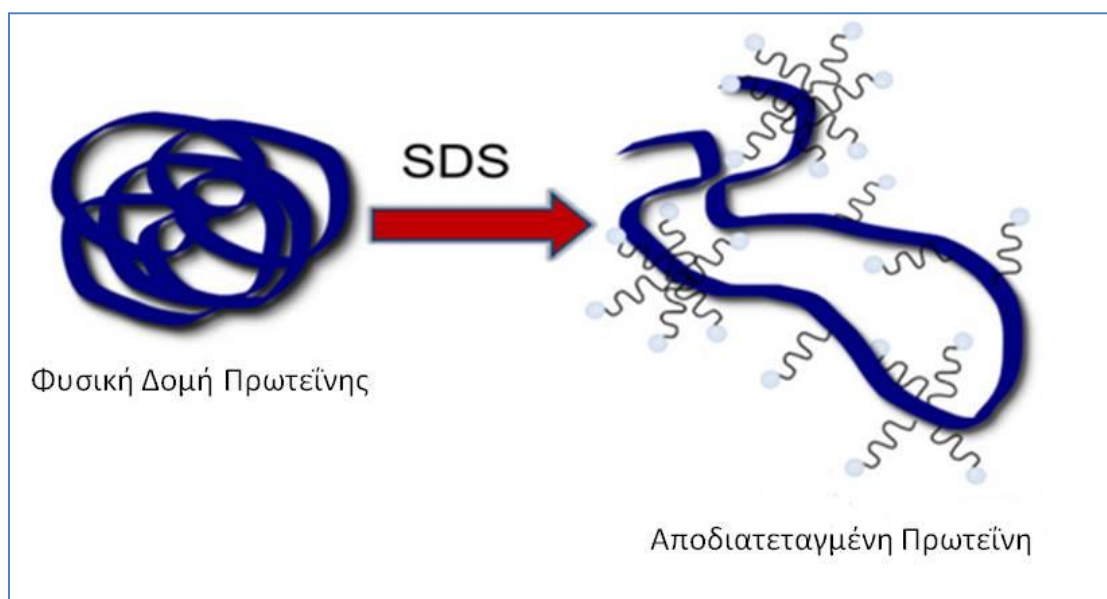
2.2.6. Ασυνεχή ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Τα βιομόρια είναι φορτισμένα σωματίδια που φέρουν θετικό ή αρνητικό φορτίο. Όταν βρίσκονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο μετακινούνται κάτω από την επίδραση του πεδίου προς τους πόλους, ανάλογα με το φορτίο τους. Ο διαχωρισμός φορτισμένων μορίων εντός ενός πηγματος με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η σχετική κινητικότητα των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από τις βιοχημικές τους ιδιότητες, όπως το φορτίο που φέρουν, τη μάζα και η στερεοδιάταξη τους, τα χαρακτηριστικά του πηγματος, όπως η θερμοκρασία, το πορώδες, και το ιζώδες αυτού, καθώς και την ένταση του πεδίου που ασκείται. Μέσω της ηλεκτροφόρησης είναι εφικτό να διαχωριστούν σύνθετα μίγματα σε πολύ υψηλή ανάλυση και η τεχνική βρίσκει εφαρμογές σε μεγάλο εύρος βιοχημικών αναλύσεων, κυρίως σε μείγματα πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Reddy and Raju 2012).

Το πηγμα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση λειτουργεί ως μοριακός ηθμός και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την κατανομή και το διαχωρισμό τους (Brunelle and Green 2014). Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες σχηματίζονται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του Ν,Νμεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{COCH}=\text{CH}_2$), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για το ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό πρωτεϊνών (PolyAcrylamide Gell Electrophoresis, PAGE). Το ακρυλαμίδιο σχηματίζει αλυσίδες πολυμερών και το δισ-ακρυλαμίδιο σχηματίζει δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών ώστε να σχηματιστεί η πηκτή. Ο πολυμερισμός χρειάζεται δύο καταλύτες, το υπερθειικό αμμώνιο (APS) που λειτουργεί ως καταλύτης έναρξης της αντίδρασης, σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν με το ακρυλαμίδιο και οδηγούν στον σχηματισμό ελεύθερων ριζών ακρυλαμιδίου, καθώς και τη τετραμεθυλαιθυλαδιαμίνη (TEMED), όπου προάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών από το APS. Οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ακρυλαμιδίου με το μονομερές ακρυλαμίδιο, οδηγεί σε πολυμερισμό και σχηματισμό αλυσίδων, οι οποίες συνδέονται με το δισ-ακρυλαμίδιο και σχηματίζουν πόρους, μέσω των οποίων κινούνται οι πρωτεΐνες (Zhang et al. 2016). Το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζει την κινητικότητα των πρωτεϊνών καθώς τα μεγάλα μόρια εκτελούν μικρή κίνηση ενώ τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα. Ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος επιλέγεται το κατάλληλο ποσοστό πολυακρυλαμιδίου (5-25%) ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών και όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του πολυμερούς τόσο μικρότερο το μέγεθος των πόρων (Miękus et al. 2015).

Τα πρωτεϊνικά μόρια όταν βρίσκονται σε μέσο με διαφορετικό pH από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, συμπεριφέρονται ως φορτισμένα σωματίδια, οπότε εάν ασκηθεί επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς το θετικό ή τον αρνητικό πόλο. Η διεύθυνση της κίνησης εξαρτάται από το φορτίο της πρωτεΐνης ενώ η ταχύτητα της μετανάστευσης εξαρτάται από τη σχέση φορτίου προς μάζα, το μήκος και την στερεοδιάταξη του μορίου. Η κίνηση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει ανάλογη με το μοριακό τους βάρος με τη χρήση του ανιονικού τασιενεργού

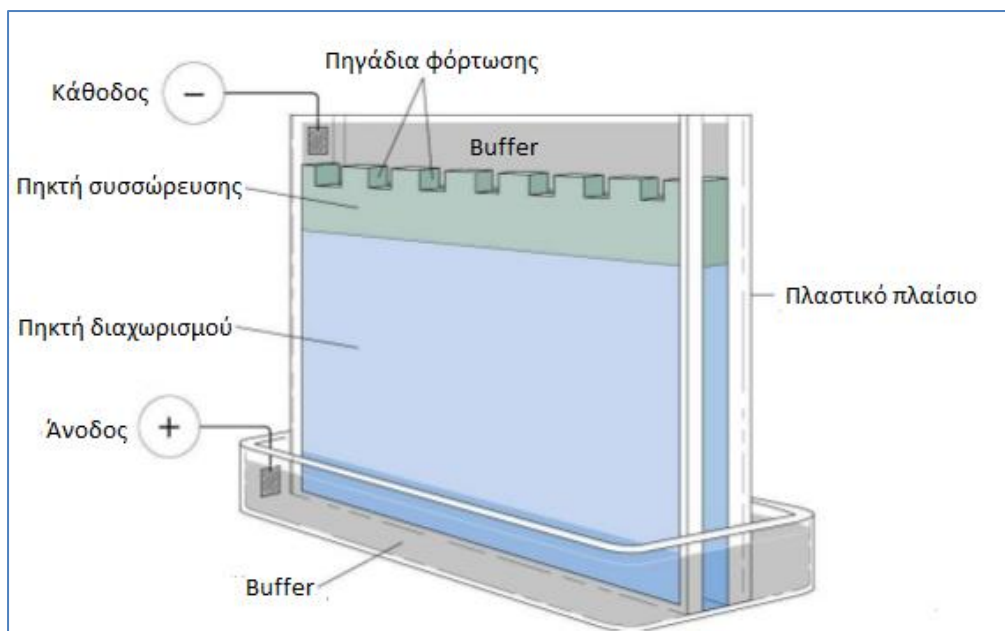
απορρυπαντικού δωδέκυλο-θειικό νάτριο (SDS). Είναι ένα μέσο που προκαλεί αποδιάταξη στις τεταρτοταγείς και δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνικών μορίων (Εικόνα 2-3) τα οποία αποκτούν τη μορφή πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Roy and Kumar 2014). Επιπλέον, το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες σε όλο το μήκος τους και δημιουργεί ομοιογενές αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο σε όλη την πεπτιδική αλυσίδα άσχετα με το αρχικό φορτίο τους. Παρουσία του SDS δημιουργούνται επιμήκη μόρια, με σταθερά κατανεμημένο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας, τα οποία παρουσιάζουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό μέγεθος (Jelińska et al. 2017).



Εικόνα 2-4. Αποδιάταξη πρωτεϊνικής δομής παρουσία SDS (Jelińska et al. 2017)

Η πιο διαδεδομένη τεχνική ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι η ασυνεχή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) κατά Laemmli (Laemmli 1970, Rath et al. 2013). Το σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δύο τύπους πηκτών, την πηκτή συσσώρευσης και την πηκτή διαχωρισμού. Τα δείγματα πρωτεϊνών εισάγονται στη πηκτή συσσώρευσης, η οποία έχει χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου ώστε να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες και να φθάνουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Στη συνέχεια εισέρχονται στη δεύτερη πηκτή που παρασκευάζεται από υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και κινούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες, πριν τη τοποθέτησή τους στο πήκτωμα, υπόκεινται σε χημική επεξεργασία με ειδικό διάλυμα που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη), ενώσεις που προκαλούν αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, ώστε να βρεθούν σε αποδιατεταγμένη μορφή και να αποκτήσουν αρνητικό φορτίο σε όλη την πεπτιδική αλυσίδα. Επιπλέον, το διάλυμα με τις πρωτεΐνες θερμαίνεται μέχρι τους 95°C ώστε να ολοκληρωθεί η αποδόμηση της στερεοδιάταξης τους. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές με κατάλληλη χρωστική

και υπολογίζεται το μέγεθος τους σε σύγκριση με τη μετακίνηση πρότυπων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους.



Εικόνα 2-5. Διάταξη ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE

2.2.7. Παρασκευή πηγματος για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ιζού επιλέχθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης με αναλογία ακρυλαμιδίου προς δις-ακρυλαμίδης 37.5:1, με συγκέντρωση 10%. Αρχικά προετοιμάζεται η πηκτή διαχωρισμού εντός της κασέτας ηλεκτροφόρησης και μετά τον πολυμερισμό της προστίθεται η πηκτή συσσώρευσης (σε αναλογία 3:1) σύμφωνα με τα διαλύματα του Πίνακα 2-2. Η κασέτα τοποθετείται στο δοχείο της συσκευής και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) το οποίο αποτελείται από 25 mM Tris (pH 8.6), 192 mM Γλυκίνη (Serva, Heidelberg, Germany) και 0.1% SDS.

Πίνακας 2-2: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού και συσσώρευσης για τη παρασκευή 10% πήγματος SDS-PAGE

Πηκτή ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE		
Διαλύματα	Πήγμα Διαχωρισμού (ml)	Πήγμα Συσσώρευσης (ml)
ddH ₂ O	2.037	3.200
30% ακρυλαμίδη	2.5	0.650
1% δις- ακρυλαμίδη	0.975	0.500
3 M Tris, pH 8.8	1.876	-
1 M Tris, pH 6.8	-	0.625
10% SDS	0.075	0.050
TEMED	0.010	0.010
10% APS	0.100	0.100

2.2.8. Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης του δείγματος 4X (Loading buffer) το οποίο περιέχει 200 mM Tris (pH 6.8), 8% SDS, 0.4% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Alfa Aesar, Ward Hill, U.S.), 40% Γλυκερόλη (Panreac Quimica, Barcelona, Spain) και 20% 2-μερκαπτοαιθανόλη (Fluka, Buchs, Switzerland). Αναμιγνύεται 1 μέρος από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης του δείγματος (4X) με 3 μέρη πρωτεϊνικού δείγματος και ακολουθεί θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά. Τέλος, φορτώνονται μέχρι 40 μL από κάθε δείγμα, ανάλογα με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και 4 μL πρωτεϊνικού μάρτυρα (Electrophoresis ladder, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, U.S.). Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης γίνεται με εφαρμογή σταθερής τάσης 80 Volt για 2,5 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολουθεί ειδική χρώση του πήγματος για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών σε αυτό.

2.2.9. Χρώση νιτρικού αργύρου (AgNO₃)

Επιλέχθηκε η μέθοδος χρώσης πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο (AgNO₃) για την βέλτιστη εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Αποτελεί μια τεχνική με υψηλή ευαισθησία που επιτρέπει την οπτικοποίηση πρωτεϊνικών ζωνών ακόμα και σε μικρές ποσότητες, απεικονίζει μπάντες άνω των 2 ng. Η χρώση βασίζεται στην επιλεκτική αναγωγή του αργύρου σε μεταλλικό άργυρο παρουσία των πρωτεϊνικών μορίων. Η ενσωμάτωση του αργύρου στις πρωτεϊνικές ζώνες διαφοροποιεί το χρώμα της πηκτής. Η διαδικασία χρώσης αποτελείται από διαδοχικά

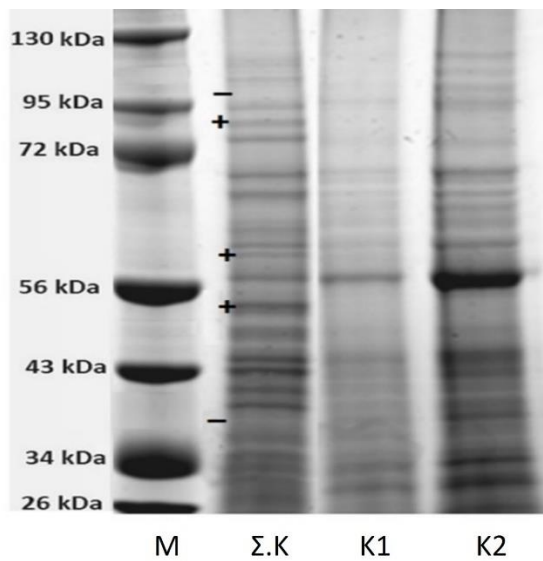
βήματα που περιλαμβάνουν σταθεροποίηση των πρωτεϊνών, ευαισθητοποίηση, εκπλύσεις, εμποτισμό με νιτρικό άργυρο και ανάπτυξη της εικόνας (Kumar 2018).

Η γέλη πολυακρυλαμίδης αφαιρείται από το δοχείο μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης και ξεπλένεται με δις-απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο χρώσης νιτρικού αργύρου σύμφωνα με τον Chevallet (2006) που περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Πρόσδεση πρωτεϊνών (fixation): Επώαση σε διάλυμα με 30% αιθανόλη και 10% οξικό οξύ για μια ώρα, για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών που εμποδίζουν τη διαδικασία. Μετά από 30 λεπτά η γέλη τοποθετείται σε φρέσκο διάλυμα και επώάζεται για όλη τη νύχτα.
- Έκπλυση: Δύο εκπλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα αιθανόλης (20%). Στη συνέχεια ακολουθούν δύο εκπλύσεις των 10 λεπτών σε δις-απεσταγμένο νερό.
- Ευαισθητοποίηση: Η γέλη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,8 mM πενταένυδρου θειοθειικού Νατρίου (Sodium Thiosulfate Pentahydrate, Ferak, Berlin, Germany) για 1 λεπτό ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία έναντι της έντασης της χρώσης.
- Έκπλυση: Δύο εκπλύσεις 1 λεπτού σε δις-απεσταγμένο νερό
- Χρώση: Επώαση σε 12 mM διάλυμα Νιτρικού Αργύρου (AgNO_3 , Merck, Darmstadt, Germany) για 30 λεπτά.
- Ανάπτυξη χρώσης (development): Η γέλη ξεπλένεται με δις-απεσταγμένο νερό και τοποθετείται σε καθαρό δοχείο που περιέχει 100 ml διάλυμα ανάπτυξης χρώσης, που περιέχει 3% ανθρακικό κάλιο (Chem-Lab, Zedelgem, Belgium), 25μl από 37% φορμαλδεΰδη (Formaldehyde solution 37%, Merck, Darmstadt, Germany) και 12,5 μl από διάλυμα 10% πενταένυδρου θειοθειικού Νατρίου. Ο σχηματισμός της απεικόνισης διαρκεί 3-45 λεπτά και χρειάζεται συνεχή παρακολούθηση.
- Τερματισμός της χρώσης: Η γέλη ξεπλένεται με δις-απεσταγμένο νερό και επώάζεται για 2-3 λεπτά σε 2% οξικό οξύ για την αποφυγή δημιουργίας υποβάθρου και την αφαίρεση περίσσειας ιόντων αργύρου.

2.2.10. Επιλογή σωμακλωνικών κάλλων

Κατά την ηλεκτροφόρηση εκχυλισμάτων από διαφορετικούς κάλους εντοπίστηκαν ομάδες που έχουν διαφορετικό προφίλ. Το φαινόμενο αυτό μπορεί αν αποδοθεί σε σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Εκχυλίσματα από τους σωμακλωνικούς κάλους χρησιμοποιήθηκαν έναντι της κυτταρικής σειράς HeLa. Παρατηρούνται διαφορές, με + οι νέες πρωτεϊνικές μπάντες και – οι απούσες.



Εικόνα 2-6 . Ηλεκτροφορητικό προφίλ σωμακλωνικών κάλων (Σ.Κ) και κανονικών κάλων (Κ1 και Κ2) χρησιμοποιώντας πρότυπες πρωτεΐνες ως μάρτυρα (Μ)

2.3. Πρωτεομική ανάλυση ιστών ιξού

Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται ή τροποποιούνται σε έναν οργανισμό ή ένα ζωντανό σύστημα (κύτταρο, ιστός, όργανο), αποτελεί το πρωτέομα και η μελέτη αυτού του συνόλου πρωτεϊνών ορίζεται ως πρωτεομική ανάλυση. Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία πρωτεϊνών και ισόμορφων τους που εκφράζονται εντός ενός συγκεκριμένου κυττάρου, ιστού, οργάνου ή οργανισμού, καθώς και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους που καθιστούν δύσκολη την περιγραφή τους (Dupree et al. 2020). Η πρωτεομική ανάλυση είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη πρωτεϊνικών ομάδων και την ερμηνεία διαφορετικών χαρακτηριστικών τους, που βρίσκει εφαρμογές στην διερεύνηση της έκφρασης, της δομής, της λειτουργίας, των τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων τους (Aslam et al. 2017).

Το πρώτο βήμα σε μια πρωτεομική ανάλυση είναι η προετοιμασία του δείγματος ώστε να παραληφθεί ο μέγιστος αριθμός πρωτεϊνών, σε καθαρή κατάσταση και χωρίς να έχουν υποστεί μετουσιώσεις μετά την απομάκρυνση των μορίων από το περιβάλλον τους. Κατά την εκχύλιση πρωτεϊνών από βιολογικά υλικά πρέπει να απομακρυνθούν ανεπιθύμητα κατάλοιπα από οργανικές ενώσεις όπως DNA, σάκχαρα, χρωστικές και λιπίδια, καθώς και ανόργανα άλατα που χρησιμοποιούνται κατά το χειρισμούς καθαρισμού ή το διαχωρισμού του δείγματος σε κλάσματα. Μετά τη παραλαβή των πρωτεϊνών του δείγματος ακολουθεί η διάσπαση τους σε πεπτίδια με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων (π.χ. θρυψίνη) ώστε να είναι εφικτή η ανάλυση τους σε φασματογράφο μάζας (Switzer et al. 2013). Μια αποτελεσματική τεχνική για το καθαρισμό και την ενζυμική διάσπαση σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων, είναι η προετοιμασία δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου (Filter-Aided Sample Preparation, FASP). Η μέθοδος επιτρέπει το γρήγορο καθαρισμό των δειγμάτων και ενδείκνυται για την επεξεργασία προϊόντων που προέρχονται

από τη λύση από κυττάρων ή ιστών. Το δείγμα τοποθετείται στον άνω θάλαμο δοχείου φυγοκέντρησης που περιέχει μεμβράνη αποκοπής ορισμένου μοριακού βάρους. Με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων το δείγμα υπόκειται σε καθαρισμό, χημική επεξεργασία (αναγωγή και αλκυλίωση) και ενζυματική πέψη με τη βοήθεια θρυψίνης. Τα πεπτίδια ανακτώνται στο κάτω θάλαμο μετά από φυγοκέντρηση (Potriquet et al. 2017, Manza et al. 2005).

Η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) είναι το δεύτερο στάδιο της ανάλυσης. Πρόκειται για μια αναλυτική τεχνική με την οποία μπορεί να ταυτοποιηθεί μία ουσία από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα της μάζας της. Είναι μια μέθοδος με πολύ υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, που παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης της δομής άγνωστων μορίων. Χρησιμοποιείται συχνά στις ομικές (omics) τεχνολογίες και ειδικότερα για την ανάλυση της δομής πεπτιδίων και πρωτεϊνών (Li et al. 2017). Τα μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε κινούμενα ιόντα, μετά διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) και ανιχνεύονται με τη μορφή ηλεκτρικού/ψηφιακού σήματος. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, μια πηγή πρόκλησης ιοντισμού, τον αναλυτή μάζας που διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με τη μάζα και το φορτίο τους και τον ανιχνευτή. Σε σύνθετα δείγματα μπορεί να προηγείται μια χρωματογραφική ή ηλεκτροφορητική διαδικασία διαχωρισμού του δείγματος (Matthiesen and Bunkenborg 2013, Somogyi 2008).

Τα δεδομένα από την ανάλυση μάζας των δειγμάτων παρέχουν πληροφορίες για την αλληλουχία των πεπτιδίων και αποτελούν το κλειδί για την αναγνώριση τους με εφαρμογές της βιοπληροφορικής. Πρόκειται για ένα διεπιστημονικό πεδίο στο οποίο συγκλίνουν διάφοροι κλάδοι όπως η βιοχημεία, η χημεία, η στατιστική, τα εφαρμοσμένα μαθηματικά, η πληροφορική και η τεχνολογία πληροφοριών ώστε να παραχθούν βάσεις δεδομένων και εργαλεία πληροφορικής για την μελέτη βιομορίων. Υπάρχουν βάσεις δεδομένων όπου με τη χρήση αλγορίθμων και εξειδικευμένων προγραμμάτων μπορεί να αναγνωρισθούν και ποσοτικοποιηθούν τα αναλυθέντα πεπτίδια, μέσω της αναζήτησης ταυτόσημων αλληλουχιών αμινοξέων. Η UniprotKB (Uniprot Knowledgebase <http://www.uniprot.org/>), αποτελεί την κύρια, σε παγκόσμιο επίπεδο βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών, και υπάρχει τεράστιος όγκος δεδομένων από πρωτεϊνικές ακολουθίες που παράγονται συνεχώς πειραματικά. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης μιας αλληλουχίας στη βάση δεδομένων γίνονται αποδεκτά όταν προσεγγίζουν συγκεκριμένη βαθμολογία πιθανότητας για την ελαχιστοποίηση εσφαλμένων ευρημάτων (Gupta and Rani 2011, Schmidt et al. 2014).

2.3.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστούς ιξού και προετοιμασία τους για πρωτεομική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα και βλαστοί από φυτά ιξού (*Viscum album subsp. abietis*) που αναπτύχθηκαν σε βλαστούς ελάτων στη Πάρνηθα, καθώς και κάλοι ηλικίας 4 μηνών που προέρχονται από *in vitro* καλλιέργεια βλαστών (Εικόνα 2-5). Τμήματα ιστών (100 mgr) από 6 κάλλους, 2 βλαστούς και 2 φύλλα προστέθηκαν σε σωληνάρια erpendorf μαζί με σε 200 μL διαλύματος εκχύλισης πρωτεϊνών που περιέχει 7M Ουρία, 2M Θιουρία, 4% CHAPS, 1%

διθειοθρειτόλη, 2% IPG αμφολύτες και 0.1M λακτόζη. Στη συνέχεια προστέθηκε μια κουταλιά από ανοξειδωτα μεταλλικά σφαιρίδια (0.9-2 mm διάμετρο) και οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε μαγνητικό μπλέντερ (bullet blender homogenizer, Next Advance) επί 5 λεπτά σε ταχύτητα 12. Ακολούθησε δεύτερος κύκλος ομογενοποίησης σε ταχύτητα 10 για 3 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση στις 16000xg, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, παραλήφθηκε το υπερκείμενο σε καθαρά σωληνάρια και προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών (Roche, Basel, Switzerland) σε συγκέντρωση 3,6%. Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80° C (Tsekouras et al. 2020).



Εικόνα 2-7. Φυτό ιξού σε κλάδο ελάτου και κάλος από βλαστό ιξού ηλικίας 4 μηνών

Από κάθε δείγμα παραλήφθηκε ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί σε 200 μg πρωτεϊνών και επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο FASP (Wiśniewski et al. 2009) με κάποιες τροποποιήσεις (Latosinska et al. 2015). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια φυγοκέντρησης με φίλτρο 30 kDa (Amicon Ultra Centrifugal filter devices, 30 kDa MWCO, Merck Millipore) και έγινε φυγοκέντρηση σε 16,000 rcf για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε εκχύλισμα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας (8M Ουρία σε 0.1M Tris-HCl, pH 8.5) και ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε και ακολούθησε αλκυλίωση των πρωτεϊνών με τη προσθήκη 0,05M ιωδοακεταμιδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας και επώαση για 20 λεπτά σε σκοτάδι, σε συνθήκες δωματίου. Το διάλυμα απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση, 16.000 rcf για 10 min, και ακολούθησαν 2 εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας και άλλες 2 με διάλυμα όξινου ανθρακικού αμμωνίου (50 mM NH₄HCO₃, pH 8.5). Οι πρωτεΐνες διασπάστηκαν ενζυμικά με τη προσθήκη θρυψίνης σε αναλογία 1:100 και επώαση μέχρι την επόμενη ημέρα σε σκοτάδι. Τα πεπτίδια κατακρημνίστηκαν μετά από φυγοκέντρηση (16.000 rcf για 10 min), λυοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.3.2. Φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με υγρό χρωματογράφο (LC-MS/MS).

Τα πεπτίδια επαναιωρήθηκαν σε 200 μL κινητής φάσης A που αποτελείται από 0.1% μурμηκικό οξύ (Formic Acid, FA) και εγχύθηκαν σε μια νάνο αντλία (Dionex Ultimate 3000 RSLs, Dionex, Camberly, UK) συνδεδεμένη με μια προστήλη 0.3 × 5 mm, 5 μm, C18, PepMap 100 μ-

Precolumn (Thermo Scientific). Η κινητή φάση A αποτελείται από νερό, 0.1% FA και η B από ακετονιτρίλιο: 0.1% FA. Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν στη νανοστήλη ανάλυσης Map RSLC C18 Easy Spray nano column, 75 μm \times 50 cm, 2 μm 100 Å, με ρυθμό ροής 300 nL / min. Η κινητή φάση αποτελείται από 2% ακετονιτρίλιο (ACN) : 0.1% FA με ρυθμό ροής 5 μL / min. Η θερμοκρασία των στηλών διατηρήθηκε στους 35°C. Η στήλη μετά από κάθε δείγμα καθαριζόταν και εξισορροπούταν. Τα πεπτίδια μετά την έξοδο τους από την LC ιονίζονταν με τη χρήση συστήματος ηλεκτροψεκασμού (Thermo Easy Spray ESI) σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Για την φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιήθηκε αναλυτής παγίδευσης ιόντων σε κυκλική κίνηση (Q Exactive Orbitrap, Thermo Finnigan, Bremen, Germany). Η έκλυση των πεπτιδίων έγινε διαβαθμισμένα, με μετάβαση από 2% (B) έως 33% (B), σε διάστημα 240 λεπτών. Η μετάβαση σε αέρια φάση των διαχωρισμένων πεπτιδίων επιτεύχθηκε με ιονισμό, έπειτα από ηλεκτροψεκασμό θετικών ιόντων σε τάση 2 kV. Μετά την ανίχνευση των ιόντων εφαρμόζεται μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα μάζας προς φορτίο (Tsekouras et al. 2020).

2.3.3. Επεξεργασία των φασμάτων μάζας (MS)

Τα φάσματα μάζας που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πακέτο λογισμικού Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Finnigan), χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης Sequest και τη βάση πρωτεϊνικών αλληλουχιών UniProt. Λήφθηκε η βάση δεδομένων *Viscum album*, στις 27 Ιουλίου 2018, η οποία περιέχει 11 καταχωρίσεις αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες ιξού. Η καρβαμιδομεθυλίωση της κυστεΐνης υπολογίστηκε ως σταθερή τροποποίηση και η οξειδωση της μεθειονίνης ως δυναμική. Είναι επιτρεπτές δύο χαμένες θέσεις διάσπασης, η ανεκτή μάζα πρόδρομων ορίζεται στα 10 ppm και η ανεκτή μάζα θραύσματος είναι 0,05 Da. Ο ρυθμός εσφαλμένης ανακάλυψης (FDR) ορίστηκε με βάση τη τιμή q-value, με αυστηρή τιμή q: 0,01 και χαλαρή τιμή q: 0,05 (Tsekouras et al. 2020).

2.4. Καλλιέργεια και διατήρηση ζωικών κυτταρικών σειρών

2.4.1. Καλλιέργεια κυττάρων

Στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού, η MCF7 (ATCC® HTB-22™, ATCC, Manassas, U.S.A) και η MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™, ATCC, Manassas, U.S.A), μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa (ATCC® CCL-2™, ATCC, Manassas, Virginia, USA) και η Vero (ATCC, Manassas, VA, USA) μια κυτταρική σειρά επιθηλιακών νεφρικών κύτταρων πράσινου αφρικανικού πιθήκου. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων όγκου 75 cm² (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium), σε 30 ml κατάλληλου θρεπτικού μέσου ανάλογα με τη κυτταρική σειρά, σε θάλαμο καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών (HEAL FORCE HF90) με σταθερή θερμοκρασία στους 37 °C και παροχής 5% CO₂. Τα κύτταρα ελέγχονται τακτικά σε ανάστροφο μικροσκόπιο (KRUSS MBL 3200), (KRUSS,

Hamburg, Germany) για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη τους. Οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε ασηπτικές συνθήκες εντός θαλάμου Θάλαμος νηματικής ροής, βιοασφάλειας επιπέδου II (Holten LaminAir).

Πίνακας 2-3: Σύσταση θρεπτικού μέσου για την καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων

Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων MDA-MB-231, MCF7, HeLa&Vero	
Συστατικά	Συγκέντρωση-Περιεκτικότητα
10X DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium (Biowest, Nuaille, France)	1X
Ορός εμβρύου μόσχου, FBS (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, U.S.)	10% v/v
Ανθρακικό νάτριο, NaHCO₃ (MP Biomedicals, Santa Ana, U.S.)	33 mM
L-γλουταμίνη (Biochrom AG, Berlin, Germany)	2 mM
100X Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Biochrom AG, Berlin, Germany)	1% v/v
100 mM Διάλυμα πυρουβικού νατρίου (Biochrom AG, Berlin, Germany)	0,5 mM

2.4.2. Απόψυξη κυττάρων

Η κρυοσυντήρηση είναι μια ιδιαίτερα επιτυχημένη διαδικασία για τη διατήρηση κυττάρων θηλαστικών που καλλιεργούνται εργαστηριακά, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα φυλάσσονται σε καταψύκτες στους -80°C ή σε υγρό άζωτο στους -196°C και διατηρούν τη βιωσιμότητά τους, δεν εμφανίζουν γενετικές αλλαγές, καταστέλλεται η βιολογική γήρανση τους και αποκαθίσταται η λειτουργικότητά τους όταν επανέλθουν σε φυσιολογικές συνθήκες. Τα κύτταρα καταψύχονται όταν βρίσκονται σε καλή μεταβολική κατάσταση με τη προσθήκη κρυοπροστατευτικών ουσιών, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, CARLO ERBA, Val de Reuil, France), ώστε να αποφευχθεί ο ενδοκυτταρικός σχηματισμός κρυστάλλων πάγου, που μπορεί να προκαλέσει διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Η προσθήκη κρυοπροστατευτικών δεν επιτρέπει να παγώσει το νερό που βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά παραμένει σε υγρή κατάσταση με πολύ υψηλό ιξώδες (Baust et al. 2009, Miyamoto et al. 2018).

Μετά την έξοδο από την κατάψυξη το δοχείο που περιέχει το εναιώρημα κυττάρων τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να υγροποιηθεί το περιεχόμενό του. Έπειτα, το περιεχόμενο μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε φλάσκα που

περιέχει κατάλληλη ποσότητα προθερμασμένου στους 37 °C θρεπτικού μέσου και τοποθετείται στον θάλαμο επώασης. Είναι σημαντικό να γίνει γρήγορα η μεταφορά του εναιωρήματος κυττάρων στο θρεπτικό μέσο, ώστε να αραιωθεί η συγκέντρωση του κρυσταλλοπροστατευτικού παράγοντα (DMSO), καθώς ενδέχεται να παρουσιάσει τοξική δράση στα κύτταρα. Με το πέρας των πρώτων 24 ωρών πραγματοποιείται παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο και συνιστάται η αλλαγή του θρεπτικού υλικού.

2.4.3. Ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Όταν τα κύτταρα καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας σε ποσοστό 80-90% πρέπει να γίνεται ανακαλλιέργεια τους. Αναρροφάτε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και ακολουθεί ξέπλυμα με 2ml διαλύματος PBS (50mM, pH=7.2). Ακολουθεί η ενζυμική αποκόλληση των κυττάρων, που είναι προσκολλημένα στο πυθμένα της φλάσκας, με τη προσθήκη 1 mL ενζυμικού διαλύματος θρυψίνης/EDTA (Biowest, Nuaille, France) για 5 min, στους 37 °C εντός του επωαστικού θαλάμου. Μετά τη διαδικασία αποκόλλησης προστίθενται 9 mL θρεπτικού υλικού για να τερματιστεί η δράση της θρυψίνης και το εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο φυγοκέντρησης (falcon) των 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 4 λεπτά, αφαιρείται το υπερκείμενο που περιέχει τη θρυψίνη και επαναιωρείται το ίζημα σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο Neubauer. Τοποθετούνται στη φλάσκα το 25% των κυττάρων σε φρέσκο θρεπτικό μέσο και παρακολουθείται η ανάπτυξη τους έως ότου καλυφθεί η επιφάνεια του πυθμένα και χρειαστεί νέα υποκαλλιέργεια, συνήθως σε διάστημα 3-4 ημερών.

2.4.4. Κρυσυντήρηση κυττάρων

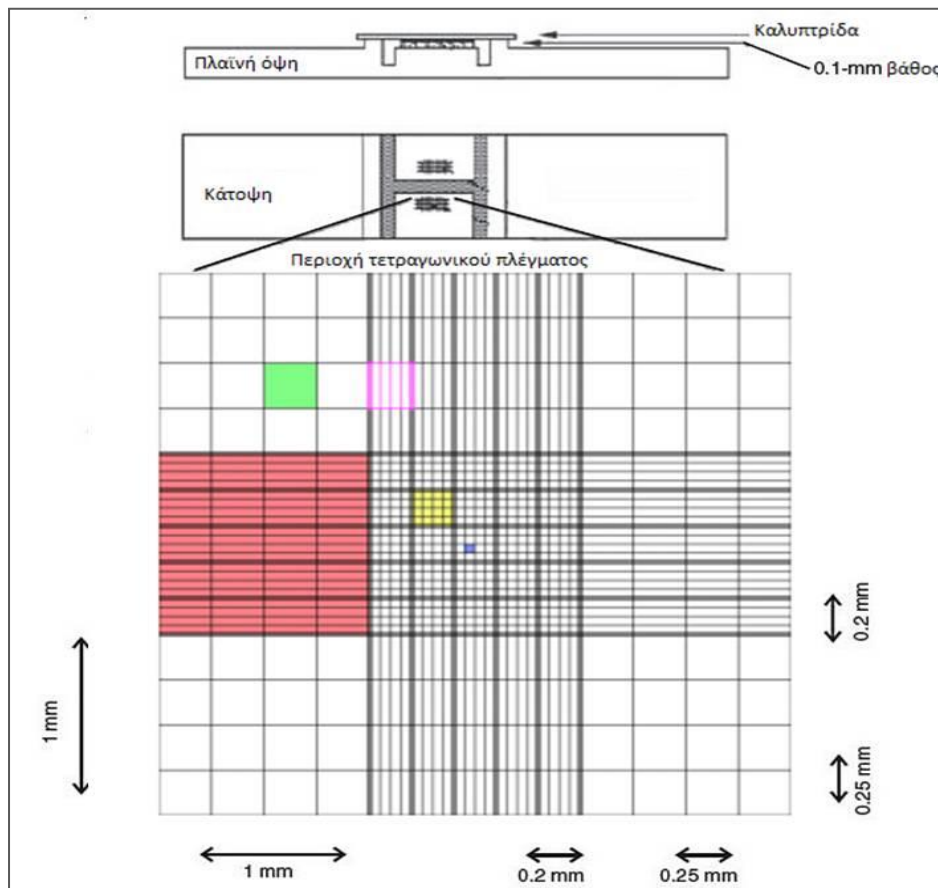
Η κρυσυντήρηση αποτελεί μία μέθοδο που χρησιμοποιεί πολύ χαμηλές θερμοκρασίες με στόχο τη διατήρηση της δομής ζωντανών ιστών και κυττάρων. Κρυσταλλοπροστατευτικές ουσίες όπως το DMSO έχουν καταλυτικό ρόλο για την διαδικασία αυτή, καθώς αποφεύγεται η δημιουργία ενδοκυτταρικού πάγου, ενώ ο ρυθμός ψύξης πρέπει να είναι σταδιακός ώστε να εξασφαλίζεται η επιβίωση των κυττάρων. Κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης αποκολλούνται από τη φλάσκα και κατακρημνίζονται μετά από φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε θερμικά απενεργοποιημένο ορό εμβρύου μόσχου (FBS) και 10% DMSO. Μεταφέρεται ποσότητα 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος σε κρύα σωληνάρια των 2 mL και επωάζονται στους 4 °C για 1 ώρα. Ακολουθεί μεταφορά τους στους -20 °C για ακόμα 1 ώρα, και στη συνέχεια μπορούν να αποθηκευτούν στους -80 °C.

2.4.5. Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ζωντανών κυττάρων είναι απαραίτητος σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας και κρυσυντήρησης κυτταρικών σειρών. Για τη διαδικασία αυτή

χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο Neuberg, μία ειδική πλάκα με 2 κοιλότητες που έχουν επεξεργαστεί ώστε να σχηματίζουν θαλάμους γνωστού όγκου με τετραγωνικά πλέγματα. Στις περιοχές αυτές προστίθεται γνωστός όγκος ελαιωρήματος κυττάρων και με τη βοήθεια της διαγράμμισης υπολογίζεται η ποσότητα των κυττάρων σε αυτόν. Τα δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων υποδιαιρούνται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Τα μεγάλα τετράγωνα που υπάρχουν στις γωνίες αποτελούνται από 16 τετράγωνα με μήκος πλευράς 0,25 mm, ενώ το κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά τετράγωνα με μήκος πλευράς 0,20 mm. Τα 25 αυτά τετράγωνα αποτελούνται από 16 ακόμα τετράγωνα το καθένα.

Στην αιματοκυτταρομετρική πλάκα τοποθετούνται 10 μL κυτταρικού ελαιωρήματος και καλύπτονται από μια καλυπτρίδα. Το κυτταρικό ελαιώρημα απλώνεται ομοιόμορφα σε όλη την τετραγωνισμένη επιφάνεια, η πλάκα μεταφέρεται σε οπτικό μικροσκόπιο (10X) και ακολουθεί η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στα μεγάλα τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Αφού ολοκληρωθεί η μέτρηση και η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων σε πέντε τετράγωνα, εξάγεται ο μέσος όρος των τιμών ο οποίος πολλαπλασιάζεται επί 10^4 ώστε να γίνει αναγωγή του αριθμού των κυττάρων ανά mL ελαιωρήματος (Sharga et al. 2018).

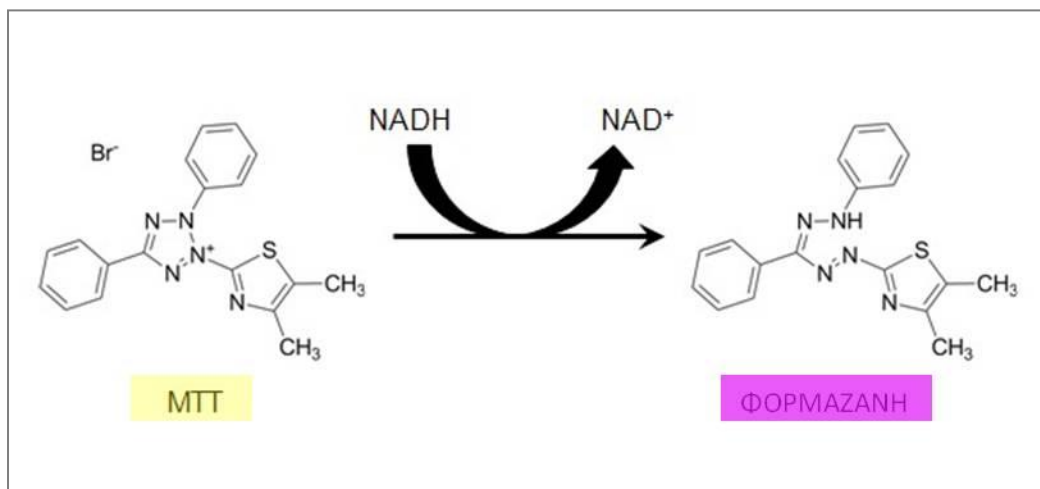


Εικόνα 2-8: Αιματοκυτταρομέτρο Neuberg (προσαρμογή από Sharga et al, 2018)

2.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυτταρικού πληθυσμού με τη μέθοδο εκτίμησης της πρόσληψης της χρωστικής MTT

Η δοκιμή βρωμιδίου του 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολίου (MTT) αποτελεί μία φωτομετρική μέθοδο που εφαρμόζεται για την ανίχνευση ζωντανών κυττάρων. Είναι μια ιδιαίτερα διαδεδομένη μέθοδος καθώς βρίσκει εφαρμογή σε μαζικούς ελέγχους με τη χρήση πλακιδίων 96 φρεατίων, για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ενεργοποίησης, ανάπτυξης ή επιβίωσης (Mosmann 1983, van Meerloo et al. 2011).

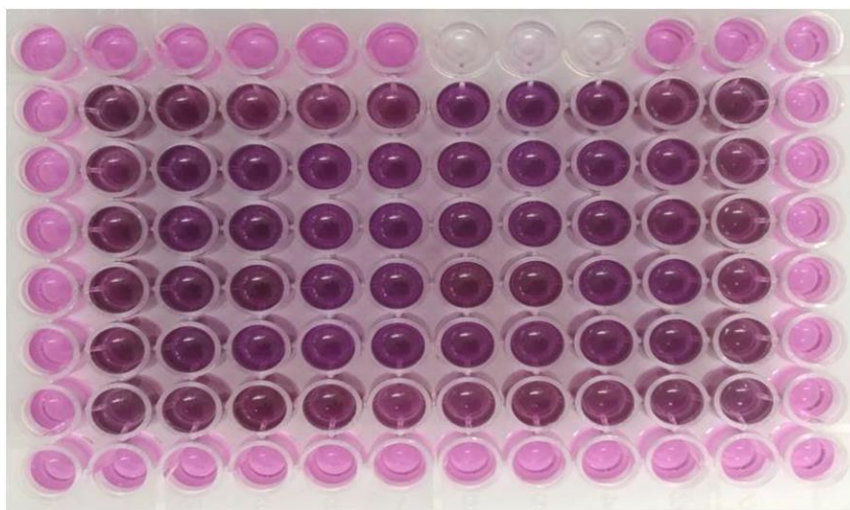
Η χρωστική MTT απορροφάται στο εσωτερικό του κυττάρου και μετατρέπεται σε ένα έγχρωμο (πορφυρό) παράγωγο φορμαζάνης. Μόνο τα ζωντανά, μεταβολικά ενεργά κύτταρα έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το MTT σε προϊόν φορμαζάνης. Η αντίδραση καταλύεται από τη μιτοχονδριακή NADPH-εξαρτώμενη οξειδοοδουκτάση, και υπάρχει άμεση συσχέτιση της μετατροπής με την μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων. Ο σχηματισμός χρώματος μπορεί να είναι χρήσιμος ως δείκτης βιώσιμων κυττάρων. Το προϊόν φορμαζάνης που παράγεται συσσωρεύεται στα κύτταρα, καθώς δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, οπότε απαιτείται λύση της μεμβράνης με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτών, όπως DMSO, ή ισοπροπανόλης, ώστε να ελευθερωθεί. Μετά την λύση, η ποσοτικοποίηση του παραγώγου της φορμαζάνης πραγματοποιείται με μέτρηση της απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, στα 560 nm (Riss et al. 2013).



Εικόνα 2-9: Σχηματισμός παραγώγου φορμαζάνης στη δοκιμή MTT (Riss et al. 2013)

Η πειραματική διαδικασία της μεθόδου είναι η ακόλουθη. Αρχικά πραγματοποιείται μεταφορά των επιλεγμένων κυττάρων σε πλακίδια μικροτιλοδότησης ELISA 96 φρεατίων, κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργεια. Για την δοκιμή βιωσιμότητας των 24 ωρών προστίθενται εναιώρημα με $8 \cdot 10^3$ κύτταρα ανά φρεάτιο, ενώ για την 48ωρη επώαση $6 \cdot 10^3$ κύτταρα ανά

φρεάτιο. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλο υπόστρωμα για 24 ώρες σε θάλαμο επώασης στους 37 °C με υγρασία και 5% CO₂. Την επόμενη ημέρα αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από τα διαλύματα εργασίας σε νέο θρεπτικό μέσο με 1% FBS. Θρεπτικό διάλυμα χωρίς διάλυμα εργασίας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο (control) των δοκιμών. Ακολουθεί επώαση για κατάλληλο χρονικό διάστημα, για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Με το πέρας του απαιτούμενου χρόνου επώασης, προστίθεται σε κάθε φρεάτιο ποσότητα της χρωστικής MTT (Sigma, St. Louis, U.S.) από διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg/mL, σε αναλογία 1:10 ως προς το θρεπτικό μέσο. Τα πλακίδια τοποθετούνται για 3ωρη επώαση στον θάλαμο ανάπτυξης. Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται το περιεχόμενο των φρεατίων και προκαλείται ρήξη των κυττάρων με τη προσθήκη 200 μL DMSO και για 5 λεπτά τοποθετούνται σε ανάδευση. Πραγματοποιείται μέτρηση σε μήκος κύματος 560 nm σε φωτόμετρο (PowerWave 340, BioTek, Winooski, U.S.) και τα αποτελέσματα υποδεικνύουν το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά την επίδραση των χειρισμών.



Εικόνα 2-10. Δοκιμή MTT σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA 96 φρεατίων,

2.6. Εκχύλιση και μέτρηση ολικών πρωτεϊνών ζωικών κυττάρων

Τα ζωικά κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλα πλακίδια ώστε να πραγματοποιηθούν φασματοσκοπικές μετρήσεις και να αξιολογηθεί η επίδραση διαφόρων χειρισμών σε παραμέτρους όπως η κυτταρική βιωσιμότητα και ο προσδιορισμός των επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου, που περιγράφονται παραπάνω. Οι κυτταρικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στη βιολογία κυττάρων και τη φαρμακολογία χρησιμοποιούν μια τιμή αναφοράς, ώστε τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για την αξιολόγηση μιας παραμέτρου σε συνθήκες διαφορετικών χειρισμών να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους (Krebs et al. 2018). Κατά συνέπεια, οι

μετρήσεις κανονικοποιούνται ως προς μια αντιπροσωπευτική τιμή του συστήματος, όπως ο αριθμός των κυττάρων, το ολικό DNA ή οι ολικές πρωτεΐνες του κυτταρικού πληθυσμού ανά φρεάτιο ώστε να διασφαλίζεται η ακριβή και συνεπή ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Ng and Ooi 2021).

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο περιλαμβάνει δύο στάδια, το στάδιο της λύσης των κυττάρων εντός των φρεατίων ώστε να απελευθερωθούν οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και το στάδιο της μέτρησης τους. Αφού έχουν ολοκληρωθεί οι χειρισμοί και οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί των υπό εξέταση παραμέτρων, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, αφαιρείται το περιεχόμενο των φρεατίων και προστίθενται επαρκή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ζωικών κυττάρων, 10 μ L για πλακίδια 96 φρεατίων και 50 μ L για πλακίδια 6 φρεατίων, το οποίο αποτελείται από τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 20 mM HEPES, pH 7,4 (Sigma, St. Louis, U.S.), 2 mM EDTA, 5 mM DTT (Fluka, Buchs, Switzerland), 0.1% CHAPS (Pharmacia, Uppsala, Sweden) και αναστολείς πρωτεασών (1187358001, Roche Diagnostics; Mannheim, Germany). Τα κύτταρα επώάζονται στους 4°C για 30 λεπτά και ακολουθεί ανάδευση τους σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Το προϊόν της λύσης των κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάρια Eppendorf και υπόκεινται σε φυγοκέντρηση με ταχύτητα 15000 χ g, για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωληνάρια και διατηρείται στους -80°C (Mavrikou et al. 2020).

Για το ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών εφαρμόζεται η μέθοδος Bradford με φωτομέτρηση στα 595 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλύματος BSA.

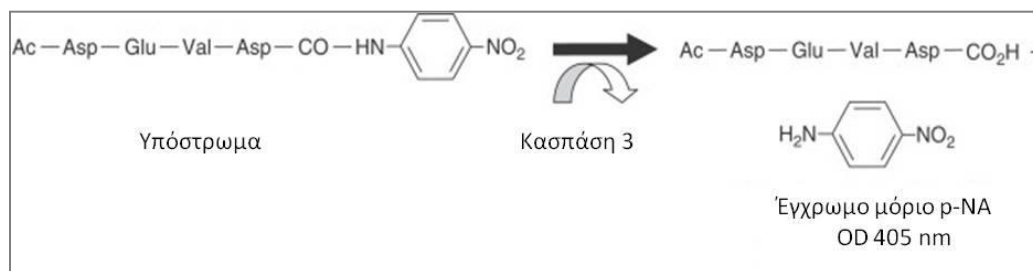
2.7. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3

Ο κυτταρικός θάνατος είναι μια θεμελιώδης διαδικασία που διατηρεί την ομοιότητα των ιστών, αφαιρεί τα ανεπιθύμητα ή κατεστραμμένα κύτταρα και διασφαλίζει την ανακύκλωση κυτταρικών συστατικών προάγοντας την περαιτέρω ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Οι κασπάσες είναι μια οικογένεια ειδικών κυστεϊνικών πρωτεασών, που διασπούν τις πρωτεΐνες στόχους σε ασπαρτικά υπολείμματα και έχουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιότητας κυττάρων και οργανισμών. Λειτουργούν ως βασικοί συντελεστές της απόπτωσης και της φλεγμονώδους απόκρισης και διακρίνονται σε τρεις λειτουργικές ομάδες (Wilson and Kumar 2018, Shalini et al. 2015) τις κασπάσες έναρξης (κασπάση-2, -8, -9-10), τις κασπάσες εκτελεστές (κασπάση -3, -6, -7) και τις φλεγμονώδεις κασπάσες (κασπάση -1, -4, -5, -11, -12). Οι κασπάσες έναρξης και οι κασπάσες εκτελεστές συντονίζονται ώστε να ενεργοποιηθούν κατάλληλα μονοπάτια που οδηγούν στην αποσυναρμολόγηση ενδοκυτταρικών συστατικών και να προκληθεί αποπτωτικός θάνατος (McIlwain et al. 2013).

Η κασπάση-3 είναι η πιο σημαντική ενδοπρωτεάση που λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της απόπτωσης των κυττάρων ως απόκριση σε γήρανση ή εξωτερικά ερεθίσματα. Ανήκει στις

κασπάσες-εκτελεστές και συντελεί στην αποδόμηση δομικών πρωτεϊνών, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον κατακερματισμό του DNA και τη κατάρρευση του πυρήνα (Santos et al. 2017). Η χορήγηση χημειοθεραπευτικών φάρμακων όπως ταξάνες, 5-φθοροουρακίλη και δοξορουβικίνη διεγείρουν αποπτωτικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του ενζύμου. Επίσης, τα επίπεδα της κασπάσης-3 σχετίζονται άμεσα με την επαγωγή απόπτωσης σε καρκίνους του μαστού και χρησιμοποιούνται ως δείκτης για την πρόβλεψη απόκρισης/αντίστασης τέτοιων τύπων κακοηθειών σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Branham et al. 2012).

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου αυτού μπορεί να επιτευχθεί φωτομετρικά με την ανίχνευση του χρωμοφόρου μορίου της πάρα-νιτροανιλίνης (p-NA). Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος βασίζεται στη χρήση του χρωματομετρικού υπόστρωματος Ac-DEVD-pNA (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide) στο οποίο επιδρά η κασπάση-3 προκαλώντας υδρόλυση και απελευθέρωση της p-NA. Η συγκέντρωση του pNA που απελευθερώνεται από τη δράσης της πρωτεάσης υπολογίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος των 405nm και τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης παρασκευασμένη με καθορισμένης συγκέντρωσης διαλύματα pNA (Peterson et al. 2010).



Εικόνα 2-71: Υδρόλυση του υποστρώματος Ac-DEVD-pNa από το ένζυμο της κασπάσης-3 προς το έγχρωμο μόριο p-NA (Schnurr et al. 2007)

Κατά την πειραματική μελέτη, για τη διεξαγωγή της παραπάνω μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο kit caspase-3 assay kit Colorimetric (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S). Αρχικά, πραγματοποιείται επίστρωση κυττάρων σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας των 12 φρεατίων, ώστε να περιέχονται $125 \cdot 10^3$ κύτταρα ανά φρεάτιο για την 24ωρη επώαση και $625 \cdot 10^2$ κύτταρα ανά φρεάτιο για την 48ωρη επώαση. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θάλαμο ανάπτυξης στους 37 °C, με υγρασία και 5% CO₂ για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το πλήρες θρεπτικό υλικό και προστίθενται κατάλληλες ποσότητες των διαλυμάτων εργασίας και τα πλακίδια τοποθετούνται στον θάλαμο για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα ώστε να ολοκληρωθεί η επίδραση των χειρισμών. Ακολουθεί αφαίρεση του περιεχομένου των φρεατίων, έκπλυση των κυττάρων με υδατικό διάλυμα PBS και προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος λύσης που αποτελείται από 50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM CHAPS και 5 mM DTT. Τα κύτταρα σε αυτό το στάδιο επωάζονται στους 4 °C για 30 λεπτά και στη συνέχεια συλλέγεται το υλικό από

κάθε φρεάτιο σε σωλήνες erpendorf. Το προϊόν της λύσης των κυττάρων υπόκειται σε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C, και το υπερκείμενο αποθηκεύεται στους -80°C. Σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης ELISA 96 φρεατίων προστίθενται 20 µL κυτταρικού εκχυλίσματος, 75 µL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 20 mM HEPES, pH 7.4, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT και 2 mM EDTA, και 10 µL διαλύματος του υποστρώματος Ac-DEVD-pNA, συγκέντρωσης 20mM. Ακολουθεί τρίωρη επώαση στους 37 °C και πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 405 nm (φωτόμετρο PowerWave 340, BioTek, Winooski, U.S.). Κύτταρα χωρίς την προσθήκη χειρισμών χρησιμοποιούνται ως μάρτυρας (control), ως θετικός μάρτυρας (positive control) χρησιμοποιούνται είτε 5 µM Δοξορουβικίνης (Doxorubicin, DOX) (Ueno et al. 2006 , Wang, Konorev, et al. 2004) είτε 5 µL διαλύματος κασπάσης-3 (100 µg/ml κασπάση-3 σε υδατικό διάλυμα 17 megohm με 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA και 10% σουκρόζη). Ως αρνητικός μάρτυρας προστίθενται 10 µL διαλύματος του παρεμποδιστή του υποστρώματος Ac-DEVD-CHO (αναστολέας κασπάσης -3, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al). Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης p-νιτροανιλίνης και κανονικοποιούνται ως προς τις ολικές πρωτεΐνες κάθε δείγματος. Η ενεργότητα της κασπάσης-3 εκφράζεται ως µmol p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά µg ολικών πρωτεϊνών.

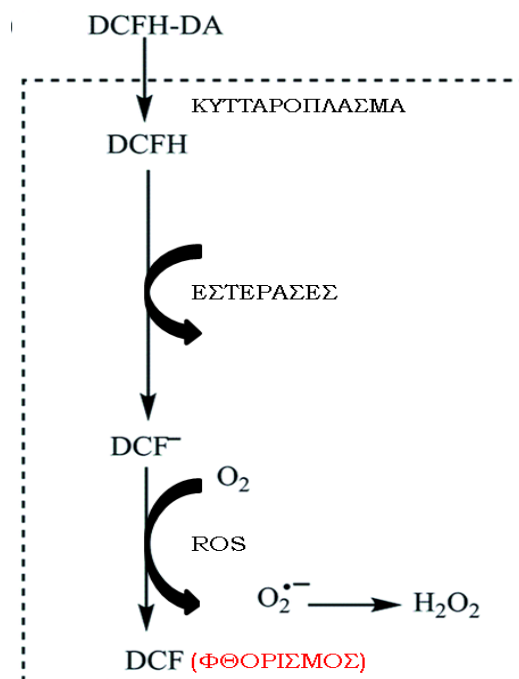
2.8. Φασματομετρικός προσδιορισμός επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS).

Η παράγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) είναι αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες και σχετίζεται με αλλαγές στο περιβάλλον των κυττάρων. Λόγω του μικρού χρόνου ζωής και της υψηλής δραστηριότητάς τους, ο προσδιορισμός των επιπέδων του ROS σε ένα βιολογικό σύστημα είναι δύσκολος και διάφορες τεχνικές και μεθοδολογίες ανίχνευσης έχουν εφαρμοστεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον εντοπισμό ROS σε συστήματα *in vitro* και *in vivo*. Βασική τεχνική για την μέτρηση των επιπέδων ROS σε ενδοκυτταρικό επίπεδο είναι ο έμμεσος φασματομετρικός προσδιορισμός της οξείδωσης που προκαλούν έναντι σε κατάλληλες χρωστικές. Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται δεν είναι τοξικοί για τα κύτταρα, μπορούν να εισέρχονται σε αυτά και να αλληλεπιδρούν με τις ενεργές μορφές οξυγόνου ώστε να παράγεται φθορίζουσα ακτινοβολία (Prasad et al. 2019).

2.8.1. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικών ROS με τη χρωστική διοξική 2,7-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH-DA)

Η χρωστική διοξική 2,7-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH-DA) είναι μια μη φθορίζουσα ένωση που λόγω της διακετυλομάδας DA έχει λιπόφιλο χαρακτήρα και μπορεί να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, ώστε να φτάνει στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, υδrolύεται παρουσία εστερασών στη μορφή 2,7-διχλωρο- διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH), η

οποία είναι μη περατή από τις μεμβράνες και εγκλωβίζεται στο κυτταρόπλασμα. Το μόριο διαχέεται ενδοκυτταρικά και οξειδώνεται από τη δράση ενεργών μορφών οξυγόνου προς το φθορίζον μόριο DCF (Εικόνα 2-8). Η τελική ένωση εμφανίζει έντονο φθορισμό με απορρόφηση στα 485 nm και εκπομπή στα 535 nm, και η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS (Zhang et al. 2018). Η διαδικασία φθορισμομετρικού προσδιορισμού των ROS με τη χρήση χρωστικής DCFH-DA DCF μπορεί να υλοποιηθεί σε κατάλληλα πλακίδια μικροτιτλοδότησης ELISA, που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα καθώς οι δοκιμές σε πλακίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτόχρονους ελέγχους με υψηλή απόδοση, μικρό χρόνο ανάλυσης και χαμηλό κόστος (Ng and Ooi 2021).



Εικόνα 2-82: Επίδραση ενδοκυτταρικών ενεργών μορφών οξυγόνου στη χρωστική 2,7-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH-DA) και τη παραγωγή φθορισμού.

Χρησιμοποιούνται πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων, μαύρου χρώματος με διαφανή πυθμένα (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) στα οποία τοποθετούνται κύτταρα σε πληθυσμό $8 \cdot 10^3$ ανά φρεάτιο για την 24ωρη επώαση και $6 \cdot 10^3$ ανά φρεάτιο για την 48ωρη επώαση. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κανονικές συνθήκες για 24 ώρες, την επόμενη ημέρα απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και προστίθενται κατάλληλα διαλύματα με τους επιθυμητούς χειρισμούς. Μετά το διάστημα επώασης, 24 ή 48 ώρες αντίστοιχα, χρησιμοποιείται διάλυμα 400 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂, Merk, Darmstadt, Germany) ως θετικός μάρτυρας και διάλυμα 500 μM N-ακετυλο-L-κυστεΐνης (NAC, Sigma-aldrich, St. Louis, U.S.) ως αρνητικός μάρτυρας. Ακολουθεί τρίωρη επώαση και στη συνέχεια προστίθεται η χρωστική H₂DCFDA (Molecular Probes, Eugene, U.S.) σε κάθε φρεάτιο σε συγκέντρωση 5 μM . Τα κύτταρα επαποθετούνται στον θάλαμο καλλιέργειας για 30 λεπτά. Μετά την επώαση, αφαιρείται το

περιεχόμενο των φρεατίων, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με ποσότητα διαλύματος PBS και πραγματοποιείται μέτρηση σε φωτόμετρο φθορισμού (Tecan Infinite M220 Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) στα μήκη κύματος των 485 nm για την απορρόφηση και 535 nm για την εκπομπή (Wu and Yotnda 2011). Για κάθε δείγμα και μάρτυρα εφαρμόζεται επαρκείς αριθμός επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αξιοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων ROS, μετά από κανονικοποίηση του φθορισμού με βάση τη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών σε κάθε χειρισμό.

2.8.2. Προσδιορισμός μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου με τη χρωστική MitoSOX™ Red

Για την φθορισμομετρική ανίχνευση του μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου χρησιμοποιήθηκε η χρωστική MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), μια φθορίζουσα χρωστική, ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανίχνευση O₂⁻ στα μιτοχόνδρια. Η MitoSOX™ Red διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, εδράζεται στα μιτοχόνδρια και φθορίζει μετά από αλληλεπίδραση με το ανιόν του σουπεροξειδίου. Η φθορίζουσα ακτινοβολία που προκύπτει είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση O₂⁻, οπότε είναι δυνατή η ανίχνευση της παραγωγής και ο προσδιορισμός των επιπέδων O₂⁻ εντός των μιτοχονδρίων (Ghanian et al. 2018).

Κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24h σε μαύρα πλακίδια μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων με διάφανο πυθμένα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν κατάλληλοι χειρισμοί για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών, ενώ χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αντιμυσίνης (Antimycin-A) σε συγκέντρωση 50μM ως θετικός μάρτυρας. Μετά την ολοκλήρωση του χρονικού διαστήματος μεταχείρισης των κυττάρων απομακρύνεται το περιεχόμενο των φρεατίων και προστίθενται 200μL διαλύματος που περιέχει 5 μM MitoSOX Red. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τη χρωστική για 10 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS. Ο φθορισμός μετρήθηκε σε φωτόμετρο φθορισμού (Tecan Infinite M220 Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) στα των 510 nm για την απορρόφηση και 580 nm για την εκπομπή. Τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν με βάση το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων (Mavrikou et al. 2020).

2.9. Προσδιορισμός ανιόντος του σουπεροξειδίου με χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα.

Το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό κατά του οξειδωτικού στρες (Younus 2018), καθώς καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O₂⁻), προς μοριακό οξυγόνο (O₂) ή προς υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το ένζυμο μπορεί να προσδεθεί στην κυτταρική επιφάνεια μέσω μεμβρανικής μηχανικής και τα τροποποιημένα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε κυτταρικό αισθητήρα BERA για την ανίχνευσης του σουπεροξειδίου

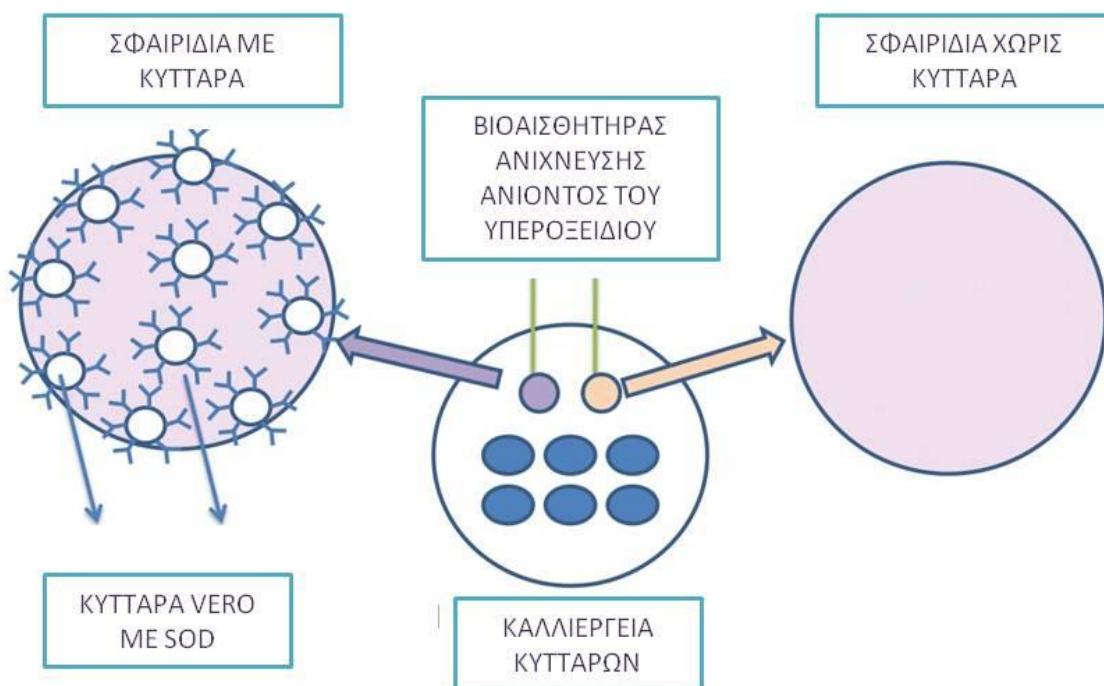
(Moschoroulou 2012). Η μεμβρανική μηχανική είναι μια μεθοδολογία που επιτρέπει την εισαγωγή υποδοχέων όπως ένζυμα, αντισώματα ή πολυσακχαρίτες στη κυτταρική μεμβράνη μέσω ηλεκτροεισαγωγής. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται εκλεκτικά σε ένα μόριο στόχο, λόγω της αλληλεπίδρασης των υποδοχέων που φέρουν με το μόριο-στόχο. Οι συζεύξεις υποδοχέα-στόχου προκαλούν τροποποιήσεις στη κυτταρική μεμβρανική δομή που διεγείρουν αλλαγές του μεμβρανικού δυναμικού, οι οποίες είναι μετρήσιμες με τη χρήση κατάλληλων ηλεκτροδίων (Moschoroulou et al. 2011).

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Vero (ATCC, Manassas, VA, USA), μια κυτταρική σειρά επιθηλιακών νεφρικών κύτταρα του αφρικανικού πράσινου πιθήκου. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια της φιάλης όπου καλλιεργούνται με την προσθήκη θρυψίνης για 5 min στους 37 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 4 λεπτά στους 25 °C, απομάκρυνση του ελαιώματος, μέτρηση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε συγκέντρωση 3×10^6 /mL. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο μετά από δίλεπτη φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (50 mM, pH 7,4) εμπλουτισμένο με 1500 U/mL ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού/ψευδάργυρου (CuZnSOD, EC 1.15.1.1). Το ελαιώρημα κυττάρων –ενζύμου επωάστηκε σε πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κυβέτες ηλεκτροεισαγωγής σε ηλεκτροπορωτή (Eppendorf Eporator, Eppendorf AG, Germany). Στα κύτταρα εφαρμόστηκαν 4 παλμοί σε ηλεκτρικό πεδίο 1800V/cm. Στη συνέχεια ακολούθησε άλλη μια δίλεπτη φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές και μεταφορά των κυττάρων Vero-SOD σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Ο κυτταρικός βιοαισθητήρας παρασκευάστηκε με τη μίξη 1 mL τροποποιημένων κυττάρων Vero-SOD με 2 mL αλγινικού νατρίου (Fluka, Buchs, Switzerland), 4% (β/ο). Το μίγμα προστέθηκε υπο μορφή σταγόνων, μέσω σύριγγας 22G, σε διάλυμα 0.8 M χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου διαμέτρου 2 mm, σε πληθυσμό 75×10^3 κύτταρα/σφαιρίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ηλεκτρόδια, αναφοράς και μέτρησης, κατασκευασμένα από άργυρο και φέρουν ηλεκτροχημική επίστρωση χλωριούχου αργύρου (AgCl). Ένα σφαιρίδιο με τροποποιημένα κύτταρα συνδεθηκε με το ηλεκτρόδιο μέτρησης και ένα σφαιρίδιο χωρίς κύτταρα με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Σε κάθε μέτρηση τα δύο σφαιρίδια, σύστημα βιοαισθητήρων, ήταν βυθισμένα εντός φρεατίου που περιέχει 150 μL διαλύματος του χειρισμού (Moschoroulou and Kintzios 2015). Για τις ανάγκες του πειράματος σε κάθε φρεάτιο υπήρχαν κύτταρα HeLa με αντίστοιχη ποσότητα θρεπτικού μέσου με τους υπό εξέταση χειρισμούς ώστε να διαπιστωθεί η απελευθέρωση σουπεροξειδίου από τα κύτταρα ανά δοκιμασία.

Τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν με τη συσκευή, η οποία αποτελείται από τη κάρτα PMD-1608FSA/D (Measurement Computing, Norton, MA) και το λογισμικό InstaCal (Measurement Computing), με την οποία γίνεται η καταγραφή του σήματος και επεξεργασία των δεδομένων. Η απόκριση κάθε αισθητήρα εκτιμήθηκε καταγράφοντας τις αλλαγές του δυναμικού που

παρουσιάζεται μετά την εφαρμογή του δείγματος και μέχρις ότου η απόκριση αυτή σταθεροποιηθεί. Παρατηρήθηκε ότι σε κάθε μέτρηση ο βιοαισθητήρας παρουσίασε σταθερή απόκριση σε διάστημα 100 δευτερολέπτων μετά τη βύθισή του στο μέσο καλλιέργειας. Καταγράφηκαν οι αλλαγές του δυναμικού, από τη στιγμή βύθισης έως το χρονικό διάστημα των 100 δευτερολέπτων, και ο μέσος όρος του κυτταρικού δυναμικού του αισθητήρα που καταγράφηκε σε κάθε δοκιμασία θεωρείται η αριθμητική τιμή κάθε απόκρισης. Ο μέσος όρος του κυτταρικού δυναμικού κάθε δοκιμασίας έχει βαθμονομηθεί ώστε να αντιστοιχεί σε σχετικές αλλαγές στη συγκέντρωση σουπεροξειδίου (Μαννίκου et al. 2019).



Εικόνα 2-93: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος κυτταρικού βιοαισθητήρα για τη μέτρηση επιπέδων παραγωγής σουπεροξειδίου σε καλλιέργεια κυττάρων (Μαννίκου et al. 2019)

2.10. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιξού, λεκτίνη ML-I και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) για βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές MCF7, MDA-MB-231 και HeLa.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που έχουν απομονωθεί από κάλους (ΠΕΚ, πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάλων), βλαστούς (ΠΕΒ, πρωτεϊνικό εκχύλισμα βλαστών) και φύλλα (ΠΕΦ, πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων) ιξού μελετώνται για την επίδραση που έχουν στις καρκινικές σειρές MCF7, MDA-MB-231 και HeLa. Κάθε εκχύλισμα παραλαμβάνεται μετά την κατάλληλη επεξεργασία βιομάζας ιξού που αποτελείται από τμήματα τουλάχιστον 10 διαφορετικών φύλλων, βλαστών και κάλων, ανά περίπτωση. Η δράση των εκχυλισμάτων ελέγχεται όταν

παρέχονται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τον χημικοθεραπευτικό παράγοντα 5-φθοροουρακίλη. Παράλληλα διερευνάται η επίδραση της χορήγηση καθαρής λεκτίνης ιξού ML-I (VAA pure lectin 21511006-1, bioWORLD, Dublin, OH, USA) στις κυτταρικές σειρές ή σε συνδυασμό με το φάρμακο.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μέρη του φυτού και τους κάλους αραιώνονται σε επιθυμητές συγκεντρώσεις σε μη πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων (1% FBS), DMSO και διαλύματος 50μM PBS και στη συνέχεια αποστειρώνονται με τη χρήση φίλτρου (CHROMAFIL CA-20/25, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) εντός του θαλάμου συνεχούς νηματικής ροής. Τα εκχυλίσματα κάλων (ΠΕΚ) και φύλλων (ΠΕΦ) χορηγούνται στις κυτταρικές σειρές σε συγκεντρώσεις 0,5 και 1 μg/mL, ενώ των βλαστών (ΠΕΒ) σε συγκέντρωση 0,25 και 0,5 μg/mL. Η ML-I χορηγείται σε συγκέντρωση 0,5 και 1 μg/mL.

Το πρότυπο διάλυμα της 5-φθοροουρακίλης (5FU, F6627-1G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) παρασκευάζεται με διάλυση του φαρμάκου σε DMSO, σε συγκέντρωση 40 mM. Το αρχικό διάλυμα αραιώνεται σε επιθυμητές συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας μη πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων (1% FBS) και DMSO. Οι συγκεντρώσεις της 5-FU που χορηγούνται στις κυτταρικές σειρές είναι 25 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM και 200 μM.

Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, ML-I και 5-φθοροουρακίλης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους, σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 2-4 :

Πίνακας 2-4: Παρουσίαση διαφορετικών χειρισμών, με μεμονωμένη ή συνδυαστική χορήγηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, λεκτίνη ML-I και 5-φθοροουρακίλη, σε κύτταρα HeLa.

Χειρισμός	Βιοδραστικές Ουσίες	Συγκέντρωση
0	θρεπτικό μέσο (control)	-
5-FU	5- φθοροουρακίλης	5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μM
ML-I	ML-I	50, 100, 250, 500, 1000 μg/mL
5-FU/ ML-I	χορήγηση 5-FU και ML-I πρωτεϊνικό εκχύλισμα	25 μM & 0.5 μg/mL
ΠΕΚ	κάλων (ΠΕΚ) από ιστοκαλλιέργεια βλαστών	0.5, 1 μg/mL
5-FU/ΠΕΚ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΚ πρωτεϊνικό εκχύλισμα	25 μM & 0.5 μg/mL
ΠΕΦ	φύλλων (ΠΕΦ) ιξού	0.5, 1 μg/mL
5-FU/ ΠΕΦ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΦ πρωτεϊνικό εκχύλισμα	25 μM & 0.5 μg/mL
ΠΕΒ	βλαστών (ΠΕΒ) ιξού	0.25, 0.5 μg/mL
5-FU/ΠΕΒ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΒ	25 μM & 0.25 μg/mL

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, της ML-I και του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 5-φθοροουρακίλη στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού MCF7 και MDA-MB-231, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 2-5:

Πίνακας 2-5: Παρουσίαση διαφορετικών χειρισμών, με μεμονωμένη ή συνδυαστική χορήγηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, λεκτίνη ML-I και 5-φθοροουρακίλη σε κύτταρα MCF7 και MDA-MB-231

Χειρισμός	Βιοδραστικές Ουσίες	Συγκέντρωση
0	θρεπτικό μέσο (control)	-
5-FU	5- φθοροουρακίλης (5-FU)	5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μM
ML-I	ML-I	50, 100, 250, 500, 1000 μg/mL
5-FU/ ML-I	χορήγηση 5-FU και ML-I	25 μM στα MCF7, 150 μM στα MDA-MB-231 & 0.5 μg/mL
ΠΕΚ	πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάλων (ΠΕΚ) από ιστοκαλλιέργεια βλαστών	0.5 μg/mL
5-FU/ΠΕΚ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΚ	25 μM στα MCF7, 150 μM στα MDA-MB-231 & 0.5 μg/mL
ΠΕΦ	πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων (ΠΕΦ) ιξού	0.5 μg/mL
5-FU/ΠΕΦ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΦ	25 μM στα MCF7, 150 μM στα MDA-MB-231 & 0.5 μg/mL
ΠΕΒ	πρωτεϊνικό εκχύλισμα βλαστώ (ΠΕΒ) ιξού	0.25 μg/mL
5-FU/ ΠΕΒ	χορήγηση 5-FU και ΠΕΒ	25 μM στα MCF7, 150 μM στα MDA-MB-231 & 0.25 μg/mL

2.11. Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία επεξεργάζονται στατιστικά με τη μέθοδο ANOVA για να διαπιστωθούν αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές και οι συγκρίσεις μέσω της μεθόδου Student's t test, σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με χρήση του λογισμικού πακέτου Statgraphics.000

3. Βιοτεχνολογική καλλιέργεια βιομάζας ιξού *in vitro* και συγκριτική μελέτη του πρωτεϊνικού περιεχομένου μητρικών ιστών και κάλων του φυτού.

Ο ιξός, *Viscum album* (Viscaceae), είναι ένα αιεθαλές ημιπαρασίτικο φυτικό είδος ενδημικό στην Ευρώπη. Το γένος *Viscum* είναι ευρέως διαδεδομένο σε ολόκληρο τον κόσμο και περιλαμβάνει σχεδόν 100 είδη. Ανάλογα με τη γεωγραφική τους καταγωγή, διακρίνονται ως ευρωπαϊκά, αμερικανικά, μεξικανικά, κορεατικά, αφρικανικά, ιαπωνικά και ινδικά είδη ιξού. Το *Viscum* ανήκει στην οικογένεια των Viscaceae, η οποία ανήκει στην τάξη των Santalales και θεωρείται στενά συνδεδεμένη με άλλα μέλη της οικογένειας Santalaceae και Loranthaceae (Zuber 2004, Patel and Panda 2014).

Τα είδη του Ιξού, ειδικά το ευρωπαϊκό *V. album*, θεωρούνται φαρμακευτικά βότανα για την παραδοσιακή ιατρική, και έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανθρωποσοφική ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου. Παρασκευάσματα ιξού χρησιμοποιούνται έναντι των κακοήθων όγκων, έπειτα από ζύμωση τους (Büssing 2000), ενώ αρκετά εμπορικά εκχυλίσματα όπως τα *Abnobaviscum*, *Cefalektin*, *Eurixor*, *Helixor*, *Lektinol*, *Iscador*, *Iscusin* και *Isorel* χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές θεραπείες παράλληλα με την κανονική χημειοθεραπευτική αγωγή σε χώρες της Βόρειας και Κεντρικής Ευρώπης (Vicas and Socaciu 2008). Τα εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα του *Viscum album* έχουν επιδείξει σημαντικές κυτταροτοξικές και αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις κατά των νεοπλασιών σε καρκινικές σειρές *in vitro*, σε ζωικά μοντέλα *in vivo* και σε κλινικές δοκιμές. Οι λεκτίνες και οι βισκοτοξίνες, είναι τα κύρια φαρμακευτικά μόρια του φυτού, δύο ομάδες πρωτεϊνών με ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές δράσεις. Παράλληλα, στα εκχυλίσματα έχουν εντοπιστεί δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και άλλες πρωτεϊνικές ομάδες, που επίσης παρουσιάζουν αξιόλογη βιοδραστικότητα (Ostermann et al. 2009).

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται εκλεκτικά σε υδατάνθρακες και βρίσκονται σε πολλά είδη στη φύση εκτελώντας σημαντικούς φυσιολογικούς ρόλους. Οι λεκτίνες συνδέονται αναστρέψιμα και επιλεκτικά με ορισμένα σάκχαρα, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια, λειτουργώντας ως μόρια αναγνώρισης στις κυτταρικές επιφάνειες, επηρεάζοντας τη λειτουργία των κυττάρων και τις ανοσολογικές αποκρίσεις. Ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες όπως η άμυνα των κυττάρων έναντι των παθογόνων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ανοσολογικές αντιδράσεις καθώς και αντιμετώπιση φλεγμονών. (Silva et al. 2012). Στον Ευρωπαϊκό ιξό έχουν αναγνωριστεί τρεις ισολεκτίνες με αντικαρκινικές ιδιότητες οι ML-I, ML-II and ML-III. Τα πρωτεϊνικά ισόμορφα ταξινομούνται ως τύπου 2- τύπου πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό τους βάρος και την εκλεκτικότητα τους στη σύνδεση με υδατάνθρακες (Voelter et al. 2005). Οι βισκοτοξίνες είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους(5kDa) ομόλογες των θειονινών (Stec 2006) και ο

βασικός βιολογικός τους ρόλος είναι η άμυνα των οργανισμών, επιδεικνύοντας τοξικότητα έναντι κυττάρων ευκαρυωτικών οργανισμών. Συνολικά έξι βισκοτοξίνες, οι A1, A2, A3, B, C και 1PS, έχουν ταυτοποιηθεί σε ιστούς Ευρωπαϊκών υποειδών του *V. album* (subsp. *album*, subsp. *abietis* και subsp. *austriacum*). Οι ισόμορφές παρουσιάζουν παραλλαγές στις δομικές μορφές και κατά συνέπεια στις κυτταροτοξικές ιδιότητες που προκύπτουν από την τριτοταγή δομή τους (Urech et al. 2006, Giudici et al. 2003).

Τα τρία ευρωπαϊκά υποείδη του ιξού επιδεικνύουν σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές τόσο στην περιεκτικότητα σε λεκτίνη όσο και σε βισκοτοξίνη λόγω της εξειδίκευσης και της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου (Urech et al. 2006). Τα φυλλοβόλα δέντρα συνθέτουν κυρίως ML-I ενώ τα φυτά *V. album* που αναπτύσσονται σε έλατα και πεύκα είναι πλούσια σε ML-II και ML-III (N Singh et al. 2016). Αντίστοιχα, η εμφάνιση βισκοτοξινών εξαρτάται από τη σχέση φυτού-ξενιστή-παρασίτου αφού τα C1 και 1PS απουσιάζουν από γκι που βρίσκονται σε φυλλοβόλα δέντρα, η A1 απουσιάζει από το υποείδος *austriacum* και η A2 από το υποείδος *abietis* (Ochocka and Piotrowski 2002). Αν και τα εκχυλίσματα από διάφορα είδη *Viscum* έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές και αρκετά σκευάσματα χορηγούνται ως επικουρικά σκευάσματα στην βασική χημειοθεραπεία, ο ρόλος των συστατικών του παραμένει ασαφής και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του γκι δεν έχει διερευνηθεί διεξοδικά. Σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη (Vergara-Barberán et al. 2017), εκχυλίσματα πρωτεϊνών που προέρχονται από φύλλα του *Viscum album* L., που αναπτύσσονται στην Ισπανία σε μαύρη πεύκη (*Pinus nigra*) υποβλήθηκαν σε πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Τα φάσματα MS αντιστοιχίστηκαν με μια γενική βάση δεδομένων, το UniProt_Viridiplantae, δημιουργώντας μια λίστα με 648 αναγνωρισμένες πρωτεΐνες από διάφορα φυτά. Μια πιο συγκεκριμένη αντιστοίχιση στην τάξη Santalales, όπου ταξινομούνται τα είδη *Viscum*, οδήγησε σε μια σύντομη λίστα 28 πρωτεϊνών. Το πρωτέομα του ιξού παραμένει μέχρι σήμερα αχαρτογράφητο, και μικρός αριθμός πρωτεϊνών έχει αναγνωρισθεί.

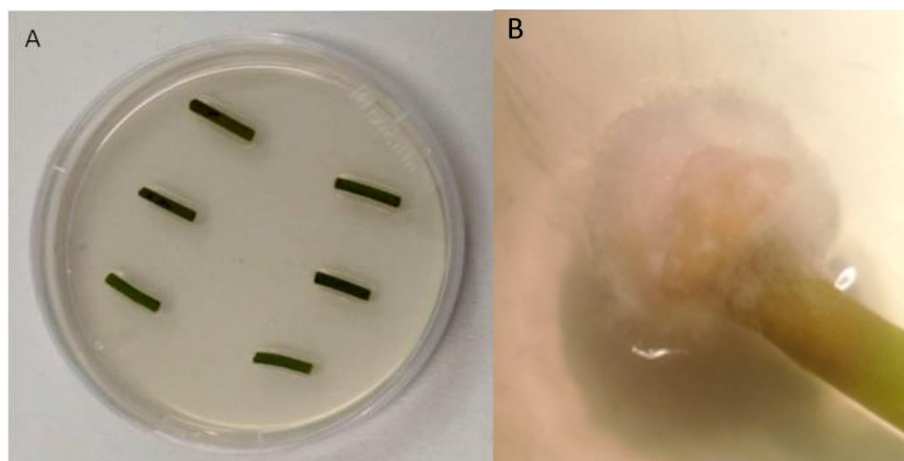
Η φαρμακευτική αξία των εκχυλισμάτων του ιξού έχει αποδειχθεί σε μια σειρά από μελέτες και οι πρωτεΐνες του θεωρούνται τα σημαντικότερα βιοδραστικά μόρια που συνθέτει το φυτό. Τα εκχυλίσματα προέρχονται βλαστούς και φύλλα που συλλέχθηκαν από τη φύση, σε φυσικούς πληθυσμούς του ημιπαρασίτου. Η περιεκτικότητα των φυτών σε βιοδραστικά μόρια εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, π.χ εποχικότητα, ξενιστή κλπ, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Για την σταθεροποίηση της παραγωγής βιοδραστικών πρωτεϊνών από τον ιξό, προτάθηκε ως εναλλακτική η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων *in vitro*. Κάλοι από εκφυτεύματα βλαστών έχουν αναπτυχθεί από τον Kintzios (2002) με στόχο την βιοσύνθεση των λεκτινών του γκι. Εκχυλίσματα πρωτεΐνης που προέρχονται από τους κάλους, εμφάνισαν σημαντικές δοσοεξερτώμενες κυτταροτοξικές επιδράσεις κατά των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, λόγω της επιγενετικής διαμόρφωσης, νέες σωματοκλωνικές πρωτεΐνες έχουν εντοπιστεί σε κάλους βλαστών του φυτού και τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από τους

ιστούς με τη παραλλακτικότητα επέδειξαν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα προς τα εκχυλίσματα που προήλθαν από τα φυτά δότες (Barberaki et al. 2015).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η βιοτεχνολογική παραγωγή βιομάζας ιξού, από κυτταρικές καλλιέργειες *in vitro*, η εκτίμηση της παραγωγής πρωτεϊνών και η συγκριτική μελέτη των βιοδραστικών πρωτεϊνών που βιοσυντίθενται σε φυτικούς ιστούς και σε κυτταροκαλλιέργειες στο εργαστήριο.

3.1. Ποσοστό καλογένεσης βλαστών ιξού και μορφολογικά χαρακτηριστικά των κάλων.

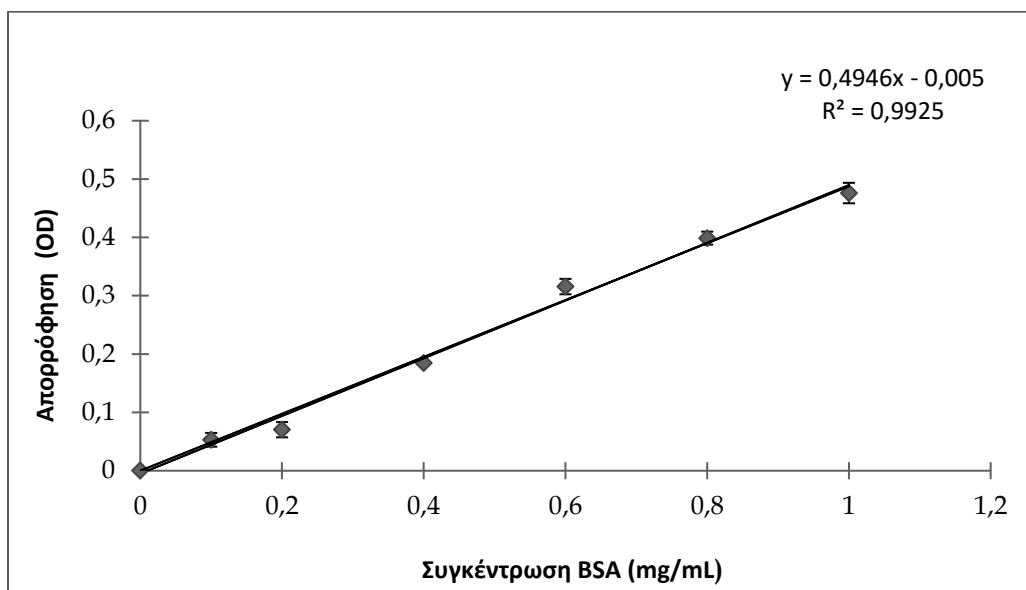
Για την μελέτη του πρωτεϊνικού περιεχομένου διαφορετικών ιστών ιξού χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από φύλλα και βλαστούς φυτών που φύονται παρασιτικά πάνω σε βλαστούς ελάτων στη Πάρνηθα κατά τη χειμερινή περίοδο, καθώς και κάλοι που σχηματίστηκαν με βιοτεχνολογικά από την *in vitro* καλλιέργεια βλαστών των μητρικών φυτών. Το ποσοστό καλογένεσης των βλαστών είναι ιδιαίτερα χαμηλό και περιορίζεται στο 6%, όπως αναφέρεται και σε προγενέστερες εργασίες (Kintzios et al. 2002). Ο Ιξός θεωρείται φυτό μη δεκτικό στην ιστοκαλλιέργεια, κάτι που οφείλεται σε διαφορετικούς λόγους όπως η κασάνωση των ιστών λόγω οξειδωσης, η παρουσία ενδοφυτικών οργανισμών που προκαλούν σημαντικές επιμολύνσεις και η νέκρωση των ιστών ως αποτέλεσμα της ισχυρής απολύμανσης που εφαρμόζεται στα έκφυτα. Οι κάλοι που σχηματίζονται χαρακτηρίζονται από συνεκτικό, κυρίως σφαιρικό σχήμα, και καλύπτονται από λευκές έως κιτρινωπές νηματοειδείς προεξοχές. Σε πρώιμα στάδια έχουν υπόλευκο έως ανοιχτό ροζ χρώμα και σταδιακά αναπτύσσουν καφέ-γκρί εμφάνιση κατά την ωρίμανση (Εικόνα 3-1).



Εικόνα 3-1: Α. Βλαστοί ιξού σε υπόστρωμα Murashige&Skoog. Β. Ανάπτυξη κάλου σε βλαστό.

3.2. Ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων βλαστών, φύλλων και κάλων ιξού.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρελήφθησαν από κάλους (ΠΕΚ), βλαστούς (ΠΕΒ) και φύλλα (ΠΕΦ) ιξού. Οι ιστοί λειοτριβήθηκαν με χρήση υγρού αζώτου, ακολούθησε εκχύλιση πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA με pH 8.5 και κατακρήμνιση τους μετά από κορεσμό 80% με θειικό αμμώνιο. Ακολούθησε επαναδιάλυση του πρωτεϊνικού ιζήματος σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (50mM PBS, pH 7.2) και καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος μέσω διαπίδυσης, στο ίδιο διάλυμα σε μεμβράνες σελλουλόζης με μέγεθος πόρων 14 kDa (MWCο) ώστε να απομακρυνθούν πρωτεϊνών με μικρότερο μέγεθος. Μετά την διαδικασία της διάλυσης υπολογίζεται η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford. Με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Εικόνα 3-2), η οποία προέκυψε από την μέτρηση της απορρόφησης γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA), υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των εκχυλισμάτων.



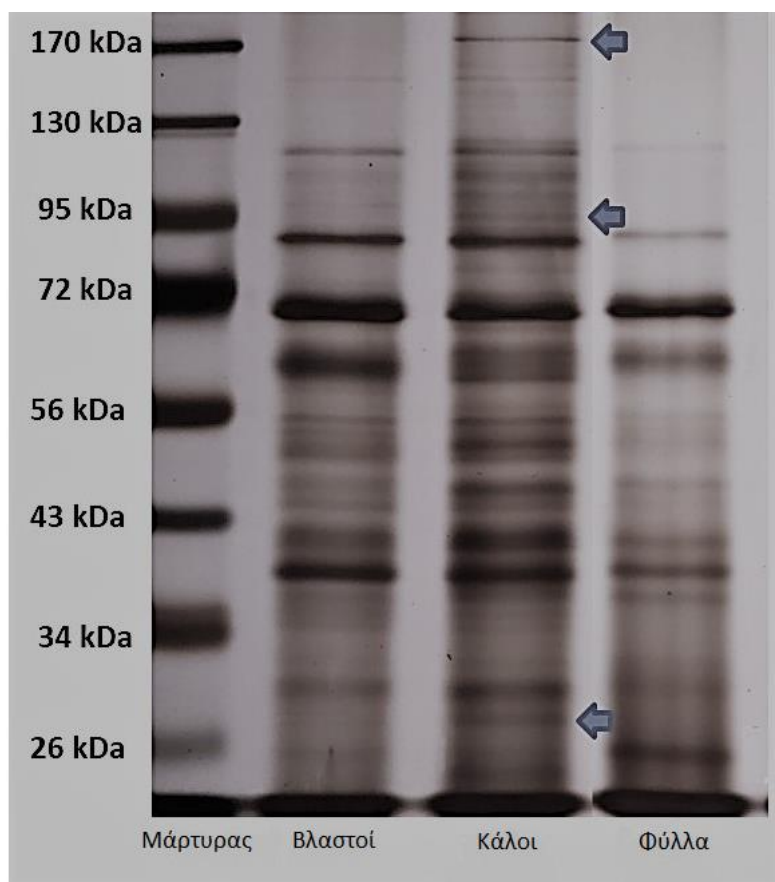
Εικόνα 3-2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων BSA με τη μέθοδο Bradford

Με βάση την εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη ($Y=0,4946 \cdot X - 0,005$, $R^2=0,9925$) υπολογίζεται η συγκέντρωση (mg/mL) των πρωτεϊνικών διαλυμάτων, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3-1: Πρωτεϊνική συγκέντρωση των φυτικών εκχυλισμάτων

Πρωτεϊνικό εκχύλισμα	Συγκέντρωση πρωτεϊνών (mg/mL)
Κάλτοι (ΠΕΚ)	0,089
Φύλλα (ΠΕΦ)	1,28
Βλαστοί (ΠΕΒ)	0,519

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) ώστε να ανιχνευτούν διαφορές στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών ιστών, φυτικών και κάλων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που παραλήφθηκαν από κάλους, βλαστούς και φύλλα ιξού παρουσιάζονται στην Εικόνα 3-2.



Εικόνα 3-2 : Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βλαστών (ΠΕΒ), κάλων (ΠΕΚ) και φύλλων (ΠΕΦ). Με τα βέλη επισημαίνεται η παρουσία μοναδικής πρωτεϊνικής ζώνης.

Παρατηρούνται διαφορές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο των ιστών καθώς το προφίλ της ηλεκτροφόρησης των επιμέρους εκχυλισμάτων παρουσιάζει διαφορετικές πρωτεϊνικές ζώνες

ανά περίπτωση. Ειδικότερα στο εκχύλισμα των κάλων παρατηρούνται 3 νέες ζώνες που αντιστοιχούν σε πολυπεπίδια με μοριακό βάρος 28 kDa, 95 kDa και 170 kDa.

3.3. Ταυτοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου βλαστών, φύλλων και κάλων ιξού και ανίχνευση αντικαρκινικών μορίων μέσω πρωτεομικής ανάλυσης.

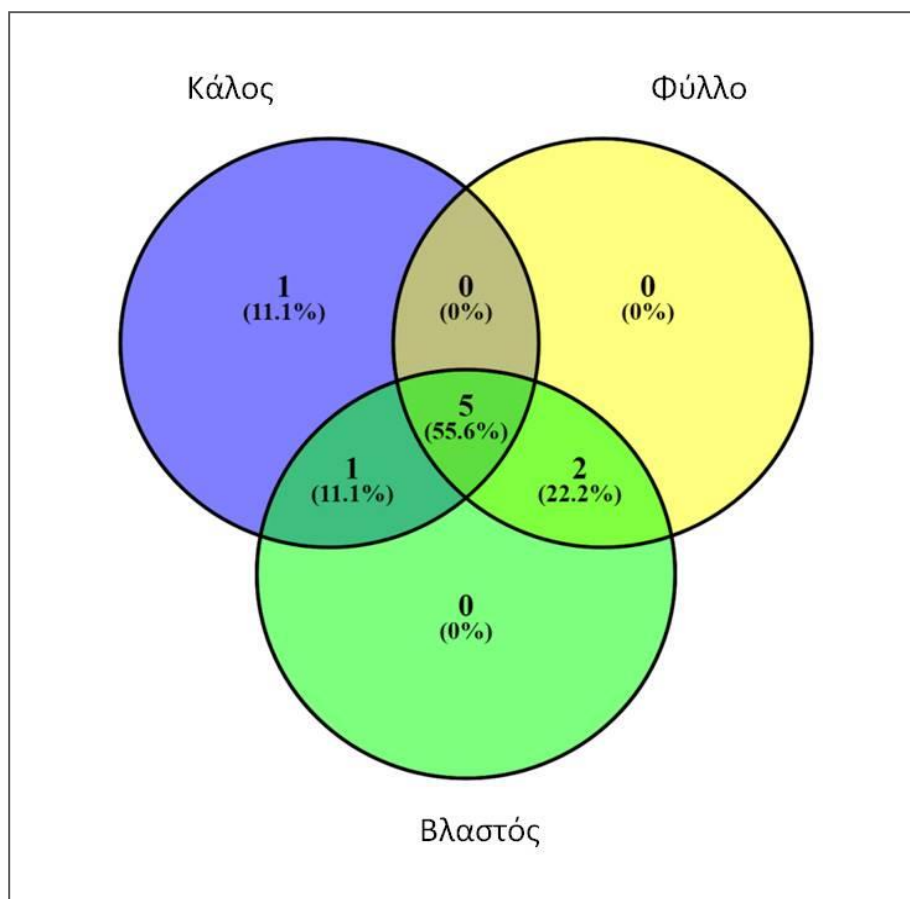
Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαφορετικών ιστών του *Viscum album* subsp *abietis* αναλύθηκε με χρωματογραφία μάζας σε σύζευξη με υγρό χρωματογράφο. Τα φάσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών Uniprot *Viscum album*, η οποία περιέχει έντεκα καταχωρίσεις αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες ιξού. Μετά την επεξεργασία των φασμάτων εντοπίστηκαν εννέα διαφορετικές πρωτεΐνες που παράγονται σε διαφορετικούς ιστούς του ιξού, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3-1 που ακολουθεί.

Πίνακας 3-2: Πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν σε δείγματα που ελήφθησαν από βλαστούς φυτών ιξού (B), φύλλα φυτών ιξού (Φ) και κάλους (Κ) που σχηματίστηκαν από βλαστούς των μητρικών φυτών.

Κωδικός εισαγωγής στη Uniprot	Όνομα εισαγωγής στη Uniprot	Ιστός κάλος (Κ), φύλλο (Φ), βλαστός (B)	Πρωτεΐνη
P01538	THN3_VISAL	(Φ), (B)	Βισκοτοξίνη A3
P08943	THNB_VISAL	(Κ), (B)	Βισκοτοξίνη B
P83554	THNC_VISAL	(Φ), (B)	Βισκοτοξίνη C1
P81446	ML1_VISAL	(Κ), (Φ), (B)	A αλυσίδα λεκτίνης ιξού -1 (ML-1)
Q6H266	ML2_VISAL	(Κ), (Φ), (B)	Λεκτίνη ιξού -2 (ML-II)
P82683	ML3_VISAL	(Κ), (Φ), (B)	Λεκτίνη ιξού -3 (ML-III)
Q6ITZ3	ML4_VISAL	(Κ)	Λεκτίνη ιξού-4 (ML-IV)
P81859	CBLE_VISAL	(Κ), (Φ), (B)	Λεκτίνη ιξού πρόσδεσης σε χιτίνη (cbML)
P48718	RBL_VISAL	(Κ), (Φ), (B)	Μεγάλη αλυσίδα του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωσφοροριβουλόζης (RUBISCO)

Παρατηρούνται διαφορές ως προς τη πρωτεϊνική σύσταση των βλαστών, φύλλων και κάλων ιξού. Σε σύνολο εννέα πρωτεϊνών, μόνο πέντε ήταν κοινές στα δείγματα που

αναλύθηκαν, οι τρεις βασικές λεκτίνες ιξού ML-I, ML-II, ML-III, το ένζυμο καρβοξυλάση/οξυγενάση της 1,5-διφωσφοροριβουλόζης (RUBISCO) και η λεκτίνη ιξού πρόσδεσης σε χιτίνη (chitin-binding Mistletoe Lectin, cbML). Μία πρωτεΐνη, η λεκτίνη ιξού ML-IV, εντοπίζεται μόνο σε κάλους κάτι που υποδεικνύει ότι η καλογένεση ενεργοποιεί τροποποιήσεις στη βιοσυνθετική οδό των λεκτινών, επάγοντας τη σύνθεση μιας νέας ισόμορφης που δεν εντοπίζεται στους μητρικούς ιστούς. Αντίστοιχα, εντοπίζονται τροποποιήσεις στη βιοσύνθεση των βισκοτοξινών και οι ισόμορφες A3 και C1 εκφράζονται μόνο στους μητρικούς ιστούς και όχι στους κάλους. Στο διάγραμμα Venn που ακολουθεί παρουσιάζονται οι αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των πρωτεϊνικών ταυτοποιήσεων σε διαφορετικούς ιστούς ιξού.



Εικόνα 3-3: Διάγραμμα Venn με τις κοινές πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν σε βλαστούς, φύλλα και κάλους ιξού.

3.4. Συμπεράσματα και συζήτηση

Τα φυτά έχουν αναγνωρισθεί από την εποχή της αρχαίας ιατρικής ως βασικές πηγές πολύπλοκων βιοδραστικών μορίων με φαρμακευτική δυναμική. Στη σύγχρονη εποχή, η βιοτεχνολογία αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την παραγωγή πολύτιμων μεταβολιτών και τη σύνθεση καινοτόμων μορίων φυτικής προέλευσης. Βιοτεχνολογικές τεχνικές, από την καλλιέργεια κυττάρων έως τη γενετική μηχανική, βρίσκουν εφαρμογές στην ενίσχυση της φαρμακευτικής παραγωγής σε φυτικά βιοεργοστάσια (Hidalgo et al. 2018).

Η καλλιέργεια κάλων έχει προταθεί ως ισχυρή εναλλακτική για τη παραγωγή φυτικής βιομάζας ιξού και κατά συνέπεια την παραλαβή επιθυμητών βιομορίων. Το ποσοστό καλογένεσης βλαστών του *Viscum album* var *abietis* καλογένεσης των βλαστών είναι ιδιαίτερα χαμηλό και περιορίζεται στο 6%. Η χαμηλή επιτυχία έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καθώς ο ιξός θεωρείται δύστροπο είδος κατά την ιστοκαλλιέργεια (Kintzios et al. 2002). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν από κάλους, βλαστούς και φύλλα έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή πρωτεϊνών ποσοτικά. Τα φύλλα είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών σε σχέση με τους βλαστούς, κάτι που αναμένεται λόγω της μεγάλης παρουσίας φυτικών ινών και αγωγών στους βλαστούς (Rafajlonska et al. 2013, Song et al. 2015). Οι κάλοι όμως είχαν σημαντικά πιο μικρή παραγωγή πρωτεϊνών ανά μονάδα βάρους σε σχέση με τα βλαστικά μέρη του φυτού δότη. Οι κάλοι προέρχονται από παρεγχυματικά κύτταρα τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό σε σχέση με τους μητρικούς ιστούς.

Η ανάλυση των δεδομένων HRMS σε συνδυασμό με τη βάση δεδομένων άλμπουμ *Viscum* ανέδειξε παραλλαγές στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη μεταξύ των στελεχών, των φύλλων και των κάλων του γκι. Μεταξύ όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν, μόνο πέντε πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με συνέπεια σε όλους τους ιστούς. Αυτές είναι οι τρεις κύριες ισολεκτίνες ML-I, ML-II, ML-III, το ένζυμο RUBISCO και η λεκτίνη cbML, που δεσμεύει εκλεκτικά χιτίνη. Τα φυτά που παράγουν πρωτεΐνες που απενεργοποιούν ριβοσώματα συχνά συνθέτουν ισόμορφες πρωτεΐνες που σχετίζονται μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία και την ειδικότητα τους (Hartley et al. 1996). Σε αυτή τη περίπτωση είναι ενδιαφέρον ότι η λεκτίνη ML-IV του γκι βρέθηκε αποκλειστικά σε κάλους. Η καλογένεση φαίνεται να ενεργοποιεί αλλαγές στη βιοσυνθετική οδό των λεκτινών, δημιουργώντας μια νέα ισομορφή που δεν αναγνωρίζεται στους μητρικούς ιστούς.

Οι διάφορες ισομορφές λεκτινών του γκι παρουσιάζουν παραλλαγές στη δομή τους και την ειδικότητα δέσμευσης υδατανθράκων, επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητά τους στην καταπολέμηση του καρκίνου (Van Damme et al., 2008). Η σύνδεση της Β-αλυσίδας σε συγκεκριμένους υποδοχείς στις κυτταρικές επιφάνειες είναι κρίσιμη για την εσωτερίκευση της

κυτταροτοξικής Α-αλυσίδας (Hoessli and Ahmad, 2008). Στη θεραπεία του καρκίνου, οι λεκτίνες *V.album* έχουν χρησιμοποιηθεί για να προκαλέσουν αντικαρκινικά αποτελέσματα είτε προκαλώντας άμεσα απόπτωση είτε έμμεσα διεγείροντας το ανοσοποιητικό σύστημα (Kim et al., 2003; Knörfel-Sidler et al., 2005; Elluru et al. , 2006). Οι λεκτίνες του γκι, όταν εισέρχονται σε κακοήγη κύτταρα, ενεργοποιούν διεργασίες που οδηγούν σε απόπτωση, που περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες (ERK1/2, ενεργοποιημένες από στρες πρωτεϊνικές κινάσες, p38 MAPK) και την ενεργοποίηση των κασπασών (Lyu et al., 2002a; Pae et al., 2001). Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος συνεπάγεται σημαντικές αλλαγές σε ζωτικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε ριβοσωμικό επίπεδο, η αλλαγή των μιτοχονδριακών μεμβρανών και η τροποποίηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (Janssen et al., 1993). Οι αλληλεπιδράσεις της αλυσίδας Α στο εσωτερικό των κυττάρων είναι υπεύθυνες για τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των λεκτινών, ενώ η Β-αλυσίδα σχετίζεται με τις ανοσοτροποποιητικές τους επιδράσεις. Οι λεκτίνες του γκι έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης έκφρασης κυτοκινών, της διέγερσης των μακροφάγων και της ενεργοποίησης των φυσικών φονικών κυττάρων (NK) και των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (Hajto et al., 2016; Melnick, 2006; Boneberg και Hartung, 2001).

Σε αναλογία με τη βιοσύνθεση λεκτινών, παρατηρήθηκαν παραλλαγές και στην έκφραση των βισκοτοξινών. Συγκεκριμένα, οι ισομορφές Α3 και C1 βρέθηκαν αποκλειστικά σε φυτά δότες και απουσίαζαν στους κάλους. Οι βισκοτοξίνες αποτελούν μια κατηγορία μικρών, τοξικών πρωτεϊνών καθοριστικής σημασίας για τον αμυντικό μηχανισμό του γκι, στοχεύοντας κυρίως τις βιολογικές μεμβράνες. Εντός των ειδών άλμπουμ *Viscum*, υπάρχουν πολλαπλές ισομορφές βισκοτοξινών, που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας αλληλουχίας αλλά μικρές δομικές διαφορές (Schradler and Apel 1991). Αυτές οι ελαφρές δομικές παραλλαγές διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην παροχή διακριτών αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Romagnoli et al. 2003) καθώς η βιοδραστικότητα των βισκοτοξινών επηρεάζεται από τα δομικά χαρακτηριστικά της επιφάνειάς τους (Coulon et al. 2003). Στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου οι βισκοτιξίνες του ιξού, σε τυποποιημένα εκχυλίσματα ή μεμονωμένες, έχουν επιδείξει κυτταροτοξικές επιδράσεις σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Knörfel-Sidler et al. 2005, Eggenschwiler et al. 2007) και επιπλέον είχαν υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές (Huber et al. 2002, Werthmann et al. 2017). Εκτός από κυτταροτοξικές επιπτώσεις, τα πολυπεπίδια διεγείρουν ανοσογονικές αποκρίσεις ενεργοποιώντας κύτταρα φυσικών φονέων (NK) (Tabiasco et al. 2002), κοκκιοκυττάρων (Stein et al. 1999) και προάγοντας την παραγωγή αντισωμάτων (Klein et al. 2002).

Η λεκτίνη πρόσδεσης χιτίνης του ιξού, cbML, είναι ένα ομοδιμερές που σχηματίζεται από δύο πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες συζευγμένες με μια δισουλφιδική γέφυρα. Παρουσιάζει δομική ομολογία με την hevein, μια πρωτεΐνη που εξάγεται από το *Hevea brasiliensis* (Voelter et al. 2000). Οι λεκτίνες που δεσμεύουν χιτίνη είναι αντιπροσωπευτικά μέλη

της οικογένειας λεκτινών hevein στα φυτά, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία περιοχών δέσμησης N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) (Itakura et al. 2017). Η χιτίνη είναι ένα πολυμερές υδατανθράκων άφθονο στη φύση, ιδιαίτερα στα έντομα, και σε αρκετούς φυτικούς οργανισμούς ανιχνεύονται λεκτίνες με υποδοχείς δέσμησης χιτίνης, και έχουν χρήση κατά την άμυνα έναντι παθογόνων που περιέχουν χιτίνη (Bueter et al. 2013).). Η cbML είναι μια πρωτεΐνη του ιξού που έχει αναφερθεί ότι επάγει κυτταροτοξικές ιδιότητες (Peumans et al. 1996), καθώς και ανοσογονικές αποκρίσεις σε ασθενείς (Klein et al. 2004).

Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν σε βλαστούς, φύλλα και κάλους ιξού έχουν σημαντική αντικαρκινική δράση, με εξαίρεση το ένζυμο RubisCO το οποίο συμμετέχει στο κύκλο του Calvin στη δέσμηση του CO₂ ατμόσφαιρα και θεωρείται η πιο διαδεδομένη πρωτεΐνη που υπάρχει (Tabita et al. 2007). Η πρωτεομική ανάλυση των κάλων, φύλλων και βλαστών του *Viscum album* var *abietis* αναδεικνύει την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαφορετικών ιστών. Η έκφραση της ισομορφής λεκτίνης του γκι ML-IV, αποκλειστικά σε βιοτεχνολογικά παραγόμενους ιστούς καθώς και η απουσία δύο βισκοτοξινών (βισκοτοξίνη A3 και C1) στους κάλους, ενώ εντοπίζονται στους μητρικούς βλαστούς, υποδεικνύουν ότι οι βιοσυνθετικές οδοί πρωτεϊνών διαφοροποιούνται κατά την καλογένεση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες των Kintzios (2002) και Barberaki (2015), που προσδιόρισαν de novo σύνθεση πρωτεϊνών σε κάλους του φυτού, και μάλιστα με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες.

4. Αποτελέσματα επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, της λεκτίνης ML-1 και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοροουρακίλη, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους, σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa.

4.1. Εισαγωγή

Οι καρκίνοι του αναπαραγωγικού συστήματος αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία και τη ζωή των γυναικών, καθώς μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύουν περίπου 110.000 νέες περιπτώσεις και 33.000 θανάτους ετησίως. Οι γυναικολογικοί καρκίνοι χαρακτηρίζονται από το προσβεβλημένο όργανο, και ανάλογα διακρίνονται σε καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας, των ωοθηκών, της μήτρας, του κόλπου, του αιδοίου και της σάλπιγγας (Siegel et al. 2019). Η θεραπεία των γυναικολογικών καρκίνων απαιτεί συνδυασμό επεμβατικών και μη επεμβατικών μεθόδων, όπως χημειοθεραπεία και ακτινοβολία, και αποσκοπεί στο να είναι να εξασφαλιστεί τόσο αποτελεσματική θεραπεία όσο και η καλύτερη ποιότητα ζωής για τους ασθενείς (Melville et al. 1999). Η χημειοθεραπεία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αντιμετώπιση της ασθένειας και στις μέρες μας εξελίσσεται σε πολύπλευρες προσεγγίσεις που ενσωματώνουν εξατομικευμένη ιατρική. Παρά την ευρεία χρήση της, η παραδοσιακή χημειοθεραπεία αντιμετωπίζει σημαντικές προκλήσεις, ιδίως την αντίσταση στα φάρμακα, υπεύθυνη για έως και το 90% των αποτυχιών της θεραπείας και την έλλειψη επιλεκτικότητας (Hammond et al. 2016, Reed and Sadozye 2016).

Ένας συχνά χρησιμοποιούμενος χημειοθεραπευτικός παράγοντας είναι η 5-φθοροουρακίλη(5-FU) (Zhang et al. 2015). Η αντικαρκινική του δράση βασίζεται στην αναστολή της θυμιδυλικής συνθάσης (TS) κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου αλλά προκαλεί κυτταρικό θάνατο αυξάνοντας τις ελεύθερες ρίζες στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιώντας έναν καταρράκτη κασπασών (Ohtani et al. 2000). Ωστόσο, η αντίσταση των κυττάρων στη 5-FU παραμένει ένα σημαντικό εμπόδιο στην κλινική θεραπεία όγκων (Wang, Cassidy, et al. 2004) και είναι απαραίτητη η ενίσχυση της ευαισθησίας των καρκινικών κυττάρων στις αποπτωτικές επιδράσεις που διεγείρει το φάρμακο, για την επιτυχία της χημειοθεραπείας (Yang et al. 2009)

Οι σύγχρονες θεραπευτικές στρατηγικές χημειοθεραπείας στοχεύουν σε κάτι περισσότερο από την πρόκληση απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα, στοχεύοντας στο περιβάλλον του όγκου και τη διέγερση των ανοσολογικών αποκρίσεων (Xu et al. 2022). Οι υφιστάμενες φαρμακευτικές ενώσεις υπόκεινται σε περιορισμούς και υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικότερων αντικαρκινικών σκευασμάτων που δεν παρουσιάζουν παράπλευρες βλάβες σε ιστούς που δεν αποτελούν στόχο (Gyanani et al. 2021). Σήμερα, ένας τεράστιος αριθμός φυσικών ενώσεων απομονώνεται και ελέγχεται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες για την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

(Graziani et al. 2018). Τα φυσικά προϊόντα είναι μια εξέχουσα πηγή σύνθετων ενώσεων με μεγάλη δομική ποικιλία και πλήθος εφαρμογών στην φαρμακευτική. Η αξιολόγηση των φαρμακευτικών δυνατοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά παραμένει προτεραιότητα, ενώ η βιοτεχνολογία προσφέρει μια σημαντική εργαλειοθήκη για την ενίσχυση της απόδοσης επιθυμητών μεταβολιτών ή την παραγωγή νέων βιοδραστικών ενώσεων (Gandhi et al. 2015, Newman and Cragg 2016).

Ο ιξός έχει σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες, κατά βάση αντικαρκινικές, οι οποίες αποδίδονται κυρίως σε δύο εξαιρετικά βιοενεργές πρωτεϊνικές ομάδες: τις βισκοτοξίνες και τις λεκτίνες. Οι βισκοτοξίνες, που κατηγοριοποιούνται ως θειονίνες τύπου III, είναι πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος περίπου 5 kDa, και κυτταροτοξικές επιδράσεις και ανοσολογικές αποκρίσεις (Knörfel-Sidler et al. 2005, Tabiasco et al. 2002). Οι λεκτίνες του γκι, που περιλαμβάνουν τρεις γλυκοπρωτεΐνες ταξινομημένες ως πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσώματος τύπου II, αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Αυτές οι ισόμορφες πρωτεΐνες ποικίλλουν ως προς τη μοριακή μάζα και την εκλεκτικότητα σε υδατάνθρακες (Lavelle et al. 2002, Tonevitsky et al. 2004). Οι λεκτίνες του ιξού θεωρούνται τα βασικά αντικαρκινικά μόρια του φυτού. Εκχυλίσματα ιξού, τυποποιημένα ως προς την περιεκτικότητά τους σε λεκτίνη, έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Παρασκεύασμα ιξού εμφάνισε αντιπολλαπλασιαστική δράση και πρόκληση αποπτωτικών μηχανισμών μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών, έναντι της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, *in vitro* και *in vivo* (Delebinski et al. 2015). Το πλούσιο σε λεκτίνη εμπορικό παρασκεύασμα Iscador®M είχε αντιπολλαπλασιαστική επίδραση σε καρκινικές σειρές, ενώ το φτωχό σε λεκτίνη εκχύλισμα Iscador P δεν είχε καμία επίπτωση τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Maier and Fiebig 2002). Το παρασκεύασμα *Abnobaviscum F*®, επάγει τον κυτταρικό θάνατο στη κυτταρική σειρά μυελογενούς λευχαιμίας K562, μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών (Park et al. 2012). Η χορήγηση καθαρής λεκτίνης ιξού σε καρκινικά κύτταρα προκαλεί αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, που αποδίδεται στις κασπάσες (Möckel et al. 1997, Bantel et al. 1999). Παράλληλα υπάρχουν αναφορές ότι οι λεκτίνες του ιξού διεγείρουν ανοσοαντιδράσεις, όπως έκκριση κυτοκινών και ενεργοποίηση φυσικών φονικών κυττάρων, ως αποτέλεσμα της επιλεκτικής δέσμησης της αλυσίδας Β στις κυτταρικές μεμβράνες, κάτι που επηρεάζει την κυτταρική σηματοδότηση (Hajto et al. 1997). Τα τυποποιημένα παρασκευάσματα γκι έχει βρεθεί ότι διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα ασθενών αυξάνοντας τα λευκοκύτταρα (Gardin 2009).

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από σωμακλωνικούς κάλους, φύλλα και βλαστούς ιξού (*Viscum album ssp. abietis*) καθώς και καθαρής λεκτίνης ιξού ML-I, στη καρκινική σειρά κυττάρων τραχήλου της μήτρας HeLa. Οι πρωτεΐνες εφαρμόστηκαν είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με το διαδεδομένο χημειοθεραπευτικό παράγοντα 5-fluorouracil (5-FU), ώστε να διερευνηθούν πιθανές συνεργιστικές δράσεις με το φάρμακο. Μελετήθηκαν τα αποτελέσματα των χειρισμών σε

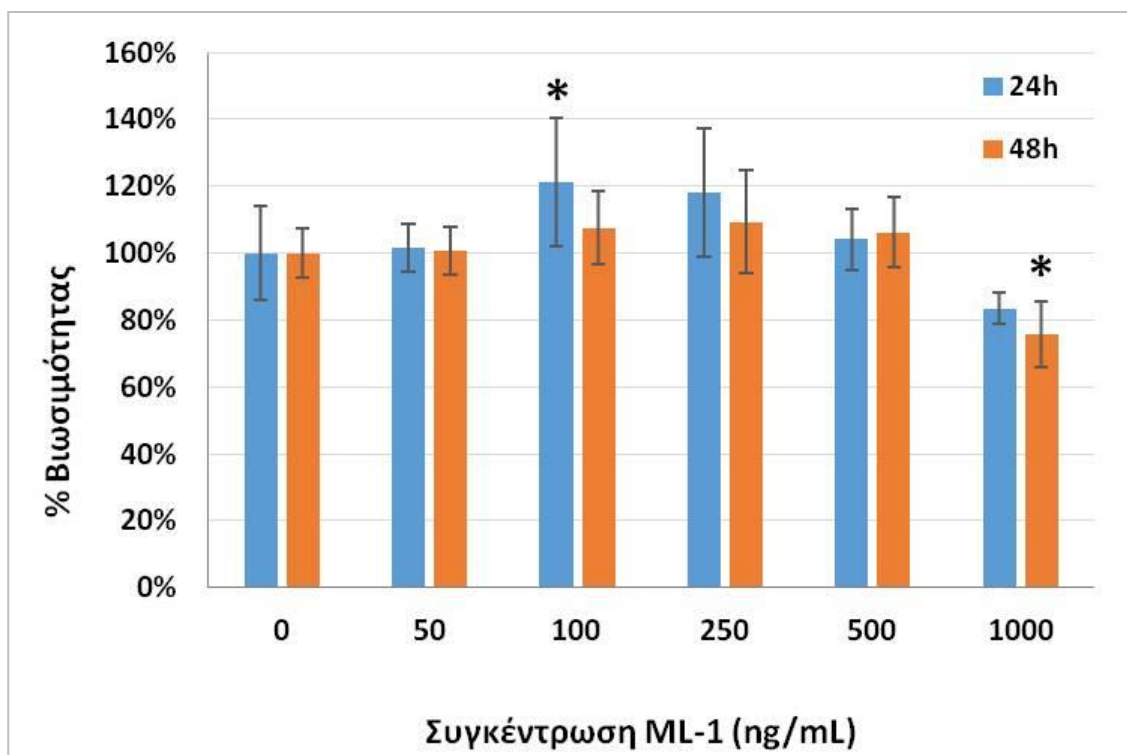
διάφορες μεταβολικές διαδικασίες όπως η κυτταρική βιωσιμότητα, η ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, το οξειδωτικό στρες και μεταβολές στα επίπεδα παραγωγής σουπεροξειδίου (O_2^-), με χρήση μη επεμβατικού κυτταρικού βιοαισθητήρα.

4.2. Αξιολόγηση της επίδρασης των χειρισμών στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa με τη μέθοδο MTT.

Ο προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων ιξού, της καθαρής λεκτίνης ML-1 και της 5-φθοριοουρακίλης στη κυτταρική βιωσιμότητα πραγματοποιείται φωτομετρικά με τη μέθοδο MTT. Η μέθοδος αντανακλά το επίπεδο μιτοχονδριακής δραστηριότητας των κυττάρων και κατά συνέπεια αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας και του ρυθμού αύξησης του κυτταρικού πληθυσμού (Rai et al. 2018, Shang et al. 2011). Τα κύτταρα επωάζονται παρουσία κατάλληλων συγκεντρώσεων των χειρισμών για 24 και 48 ώρες και τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας.

4.2.1. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa.

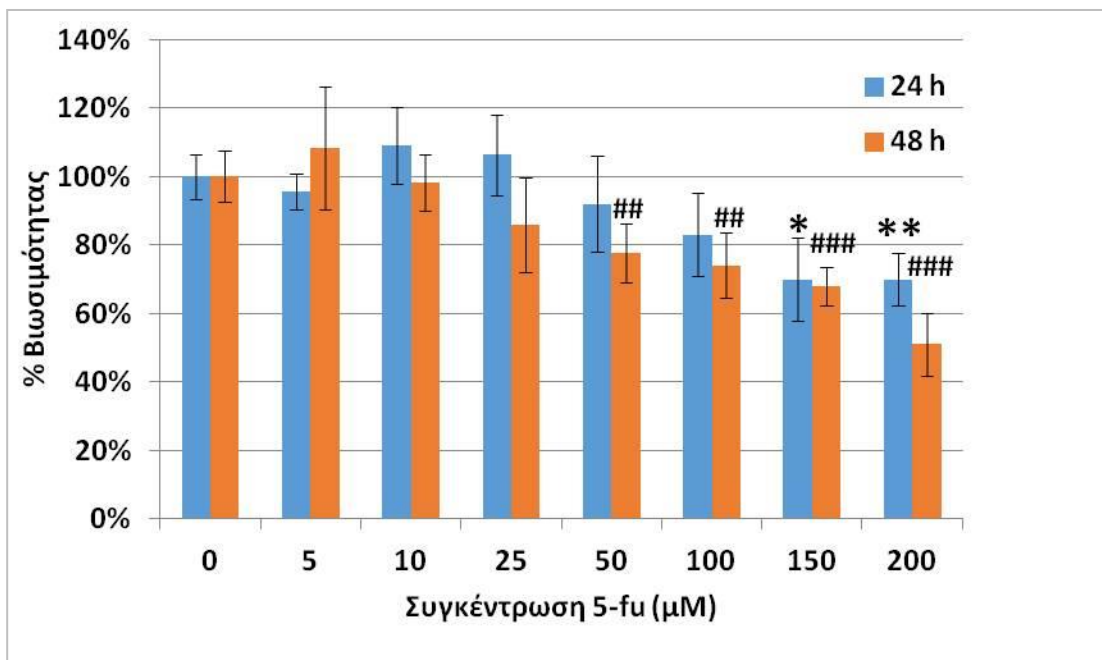
Αρχικά εκτιμήθηκε η κυτταροτοξική δράση της λεκτίνης ML-1 και του φαρμάκου 5-FU σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa. Η καθαρή λεκτίνη ML-I χορηγήθηκε στη κυτταρική σειρά HeLa σε διάφορες συγκεντρώσεις, που κυμαίνονται από 50-1000 ng/mL (Bantel et al. 1999), για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών και αξιολογήθηκε η επίδραση της κάθε συγκέντρωσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της για κάθε χρονική περίοδο παρουσιάζονται στην εικόνα 4-1 που ακολουθεί.



Εικόνα 4-1: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης ML-1 (50, 100, 250, 500 και 1000 ng/mL) για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Παρατηρείται ότι η χορήγηση της λεκτίνης ML-1 σε κύτταρα HeLa επιδρά στη βιωσιμότητα των κυττάρων ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης. Στο χρονικό διάστημα 24 ωρών η συγκέντρωση 100 ng/mL παρουσιάζει αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα ($121\% \pm 19$), ενώ οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα. Κατά την επώαση των κυττάρων με λεκτίνη για 48 ώρες, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ($75,85\% \pm 9,8$) όταν χορηγήθηκε συγκέντρωση 1000 ng/mL. Ποσότητες της λεκτίνης σε μικρότερες συγκεντρώσεις δεν προκάλεσαν διαφοροποίηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με το μάρτυρα.

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του χημειοθεραπευτικού παράγοντα 5-FU, που κυμαίνονται από 0-200 μ M, για 2 χρονικές περιόδους 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4-2.



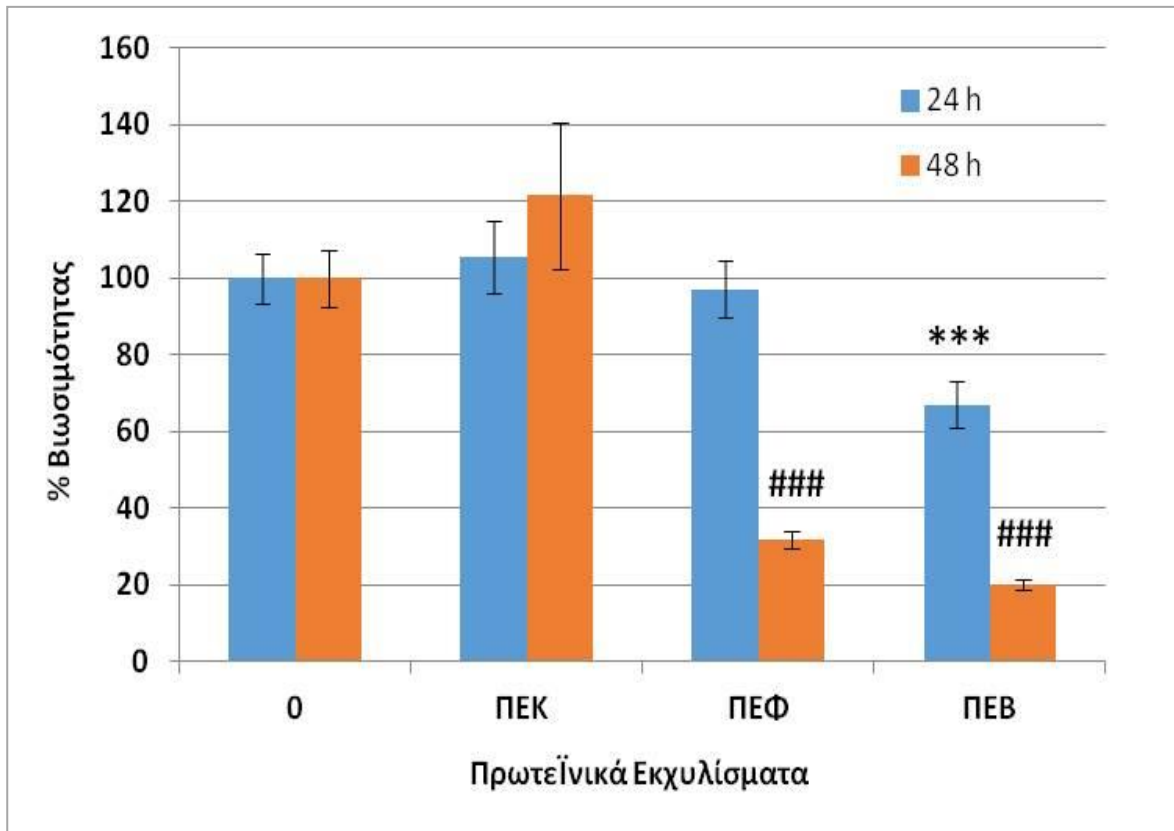
Εικόνα 4- 2: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του φαρμάκου 5-FU (5, 10, 25, 50, 100, 150 και 200 μM) για 24 48 και ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p<0.05$, **,### $p<0.01$, ***,### $p<0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

Κατά το χειρισμό των κυττάρων με 5-φθοροουρακίλη, παρατηρείται ότι ο αντικαρκινικός παράγοντας έχει σημαντική επίδραση στη κυτταρική βιωσιμότητα, ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση και το χρονικό διάστημα επώασης. Στον χειρισμό των 24 ωρών, συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 150 μM είχαν στατιστικά σημαντική κυτταροτοξική δράση, μειώνοντας τη βιωσιμότητα στο 70%. Στην επώαση για 48 ώρες, η 5-FU εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξική δράση σε χαμηλή συγκέντρωση (50 μM), όπου η κυτταρική βιωσιμότητα έφτασε στο 77,7% ($\pm 8,57$), ενώ η μεγαλύτερη δόση των 200μM προκάλεσε μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας στο 51% ($\pm 9,2$) σε σχέση με το μάρτυρα.

4.2.2. Επίδραση των εκχυλισμάτων ιξού στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa.

Η λεκτίνη ML-I παρουσίασε δραστηριότητα έναντι της κυτταρικής σειράς σε συγκέντρωση 1000 ng/mL. Αυτή η πρωτεϊνική συγκέντρωση επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως συγκέντρωση αναφοράς και τα εκχυλίσματα ιξού χορηγήθηκαν σε συγκέντρωση 1000 ng/mL, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση τους σε σχέση με τη καθαρή πρωτεΐνη. Σε προκαταρκτικά πειράματα τα εκχυλίσματα βλαστών παρουσίασαν πολύ μεγάλη κυτταροτοξικότητα και προτιμήθηκε να εφαρμόζεται μικρότερη συγκέντρωση (500 ng/mL) ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Η επίδραση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάλων (ΠΕΚ), φύλλων (ΠΕΦ) και βλαστών (ΠΕΒ) ιξού στη βιωσιμότητα των καρκινικών κύτταρων του τραχήλου της μήτρας HeLa αξιολογήθηκε με τη μέθοδο MTT σε δύο χρονικά διαστήματα επώασης, 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα της

επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού στη κυτταρική σειρά HeLa παρουσιάζονται στην εικόνα 4-3 που ακολουθεί.



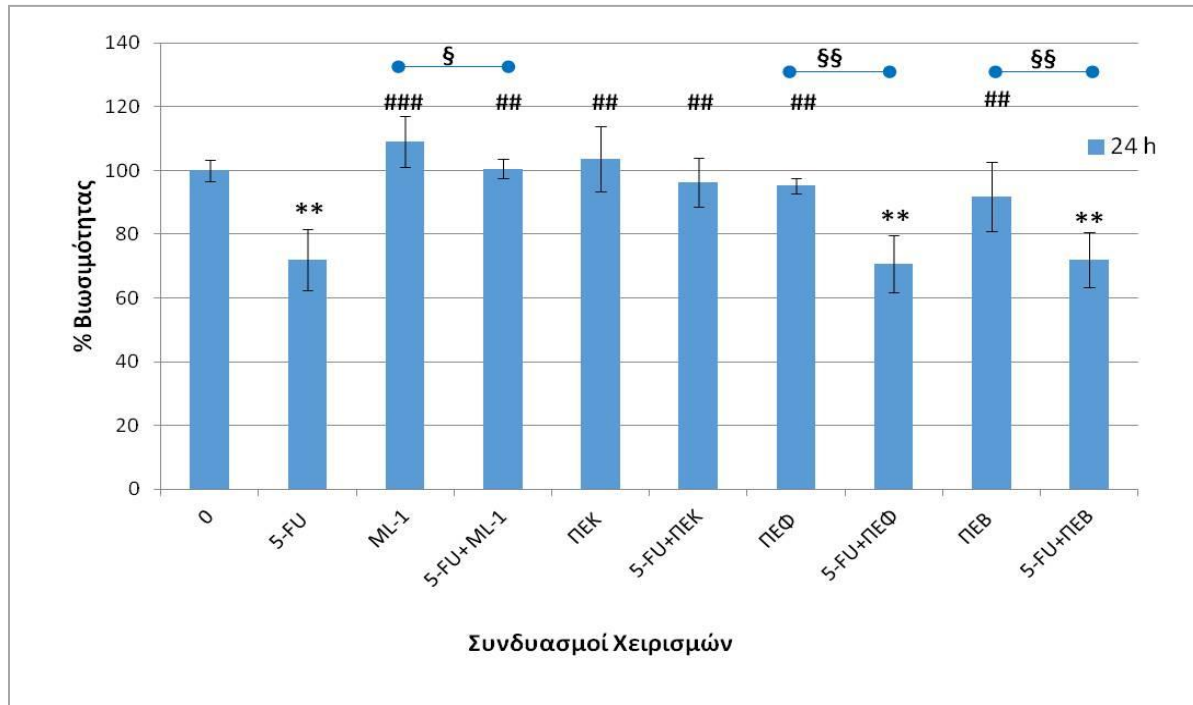
Εικόνα 4- 3 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού για 24 48 και ώρες. ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (1000 ng/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (1000 ng/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (500 ng/mL). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής ΜΤΤ. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,### $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

Από τις μετρήσεις υποδεικνύεται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa δεν επηρεάστηκε από τα εκχυλίσματα κάλων ιξού και στα δύο διαστήματα επώασης. Τα εκχυλίσματα φύλλων στο χρονικό διάστημα 24 ωρών δεν είχαν επίδραση στατιστικά σημαντική, αλλά μετά από επώαση 48 ωρών προκάλεσαν πολύ σημαντική μείωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας σε σχέση με το μάρτυρα, σε ποσοστό 31,8% ($\pm 2,34$). Τα εκχυλίσματα βλαστών αν και χρησιμοποιήθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση (500 ng/mL), προκάλεσαν σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία έφθασε στο 67,08 % ($\pm 6,03$) κατά την επώαση 24 ωρών και στο 20,12 % ($\pm 1,27$) κατά την επώαση 48 ωρών.

4.2.3. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa.

Η λεκτίνη, το φάρμακο 5-FU και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιδρούν στη βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού. ανάλογα με τη δόση και το χρόνο επώασης. Το επόμενο στάδιο είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα με τις πρωτεΐνες του ιξού, όταν χορηγούνται συνδυαστικά σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας HeLa. Για τη διερεύνηση της συνδυαστικής δράσης του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες ιξού επώαστηκαν κύτταρα υπό την επίδραση σταθερής δόσης 5-φθοροουρακίλης (150 μM) μαζί με λεκτίνη ML-I σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάλων και φύλλων σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστών σε συγκέντρωση 250 ng/mL. Η χορήγηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βλαστού και φύλλων, σε συγκεντρώσεις 500ng/mL και 1000ng/mL αντίστοιχα, προκάλεσε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά την επώαση 48 ωρών. Για να αξιολογηθεί η συνδυασμένη επίδραση των εκχυλισμάτων με την 5-FU χορηγήθηκαν τα εκχυλίσματα και το φάρμακο στο 50% της δόσης.

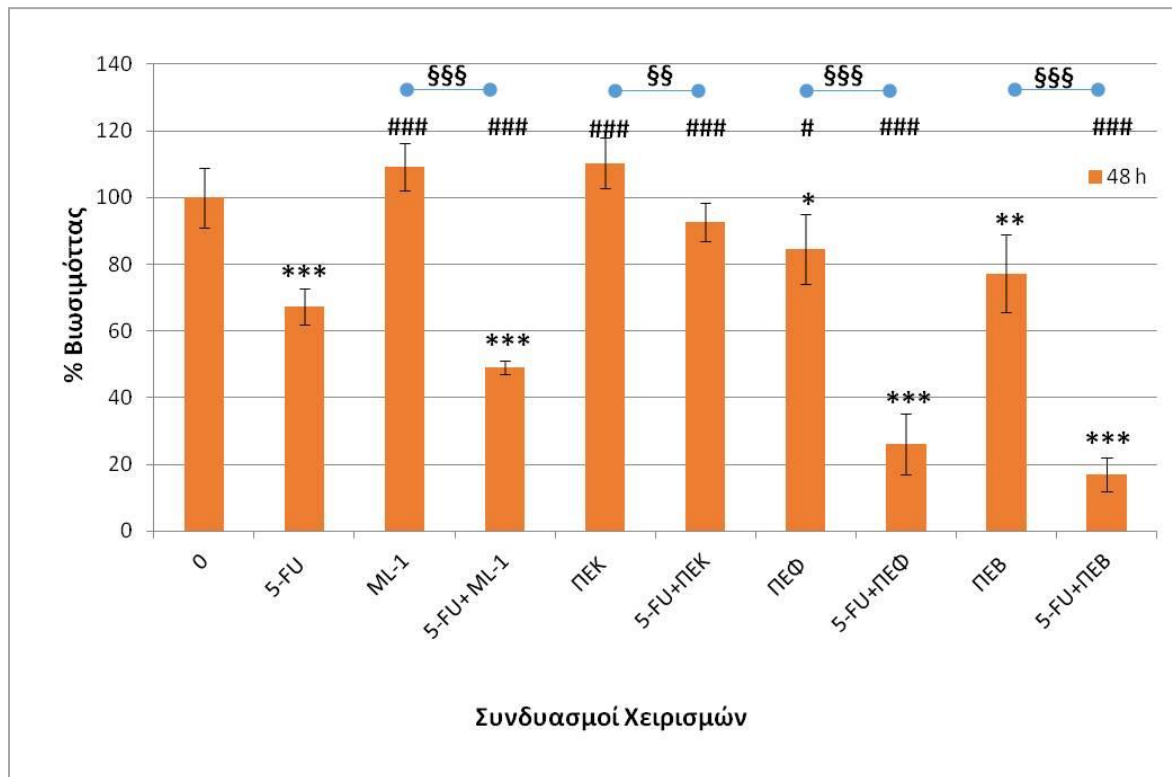
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ιξού σε συνδυασμό με τη 5-FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετά από επώαση 24 ωρών, παρουσιάζονται στην εικόνα 4-4.



Εικόνα 4- 4. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για 24 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και η λεκτίνη δεν επηρεάζουν τον κυτταρικό πληθυσμό στη δόση που χορηγήθηκαν. Η συγχορήγηση του φαρμάκου με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων (70,69%±8,85) και βλαστών (71,93%±8,66) επιδρά αρνητικά στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα, ενώ ο συνδυασμός της 5-FU με τη λεκτίνη και τα εκχυλίσματα κάλων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα. Η επίδραση της μεμονωμένης επώασης των κυττάρων με 5-FU (72%±9,7) δεν διαφέρει από την επίδραση της συνδυασμένης χορήγησης του φαρμάκου με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων και βλαστών. Οι τρεις χειρισμοί έχουν στατιστικά ισοδύναμη επίδραση στη κυτταρική βιωσιμότητα κύτταρα, ενώ οι υπόλοιποι χειρισμοί δεν επηρεάζουν το πληθυσμό μετά από επώαση για 24 ώρες.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ιξού, σε συνδυασμό με τη 5-FU, στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa μετά από επώαση 48 ωρών παρουσιάζονται στην εικόνα 4-4.

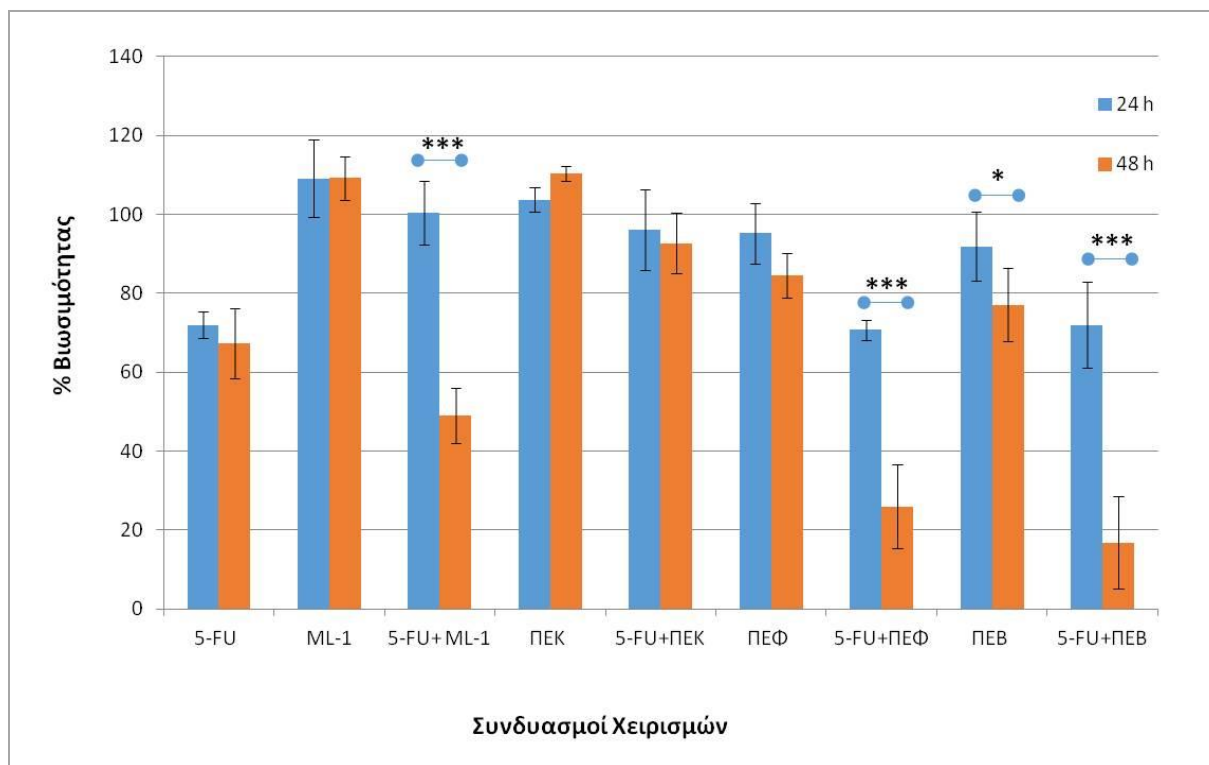


Εικόνα 4- 5. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-1 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για 48 ώρες. ML-1: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με ± % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων (84,55%±10,5) και βλαστών (77,12%±11,6) παρουσιάζουν βιολογική επίδραση στη δόση που χορηγήθηκαν, προκαλώντας μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Το φάρμακο 5-FU, όταν χορηγείται μεμονωμένο (67,35%±5,51) ή σε

συνδυασμό με τη λεκτίνη (49%±1,94), τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλων (26,01%±9,18) και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βλαστών (16,87%±5) προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με το μάρτυρα. Σε αντίθεση, η επώαση με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάλλων, μεμονωμένο ή σε συνδυασμό με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα, δεν έχει επίδραση στο κυτταρικό πληθυσμό. Παρατηρείται ότι η συνδυασμένη χορήγηση της 5-FU με τη λεκτίνη και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων και βλαστών, παρουσιάζει σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, σε επίπεδα πολύ κατώτερα από ότι προκαλεί η μεμονωμένη μεταχείριση των κυττάρων με το φάρμακο ή τις πρωτεΐνες ιζού.

Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο επώαστηκαν τα κύτταρα με σταθερές δόσεις πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και καθαρής λεκτίνης μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη επηρεάζει σημαντικά τη κυτταρική βιωσιμότητα. Στην εικόνα 4-6 παρουσιάζονται συνδυαστικά τα αποτελέσματα της δοκιμής MTT για τις δύο χρονικές περιόδους επώασης, 24 και 48 ωρών.



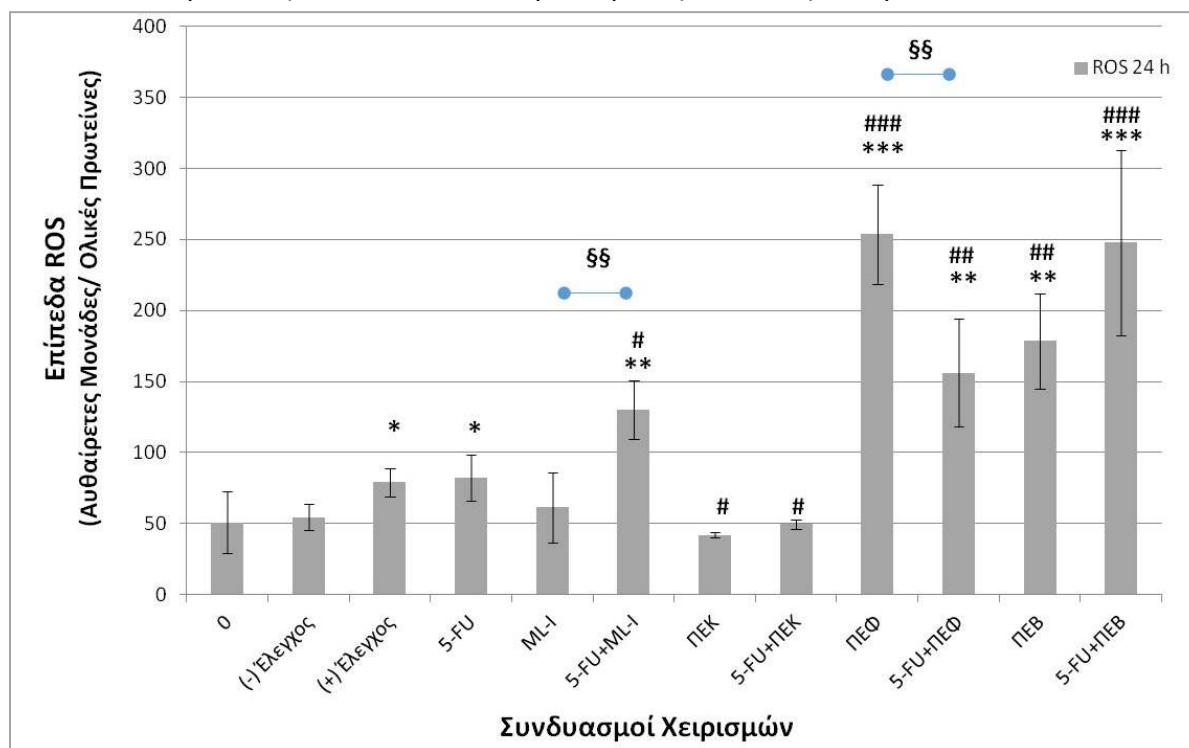
Εικόνα 4- 6. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιζού και λεκτίνης ML-1 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για χρονικό διάστημα 24 και 48 ωρών. ML-1: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με ± % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων βλαστού επηρεάζεται σημαντικά από το χρόνο επώασης, ειδικά όταν χορηγούνται παράλληλα με τη 5-FU. Η συνδυασμένη χορήγηση της

λεκτίνης και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος φύλλων με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα έχει μεγαλύτερη επίδραση όσο αυξάνει το χρονικό διάστημα επώασης.

4.3. Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά HeLa.

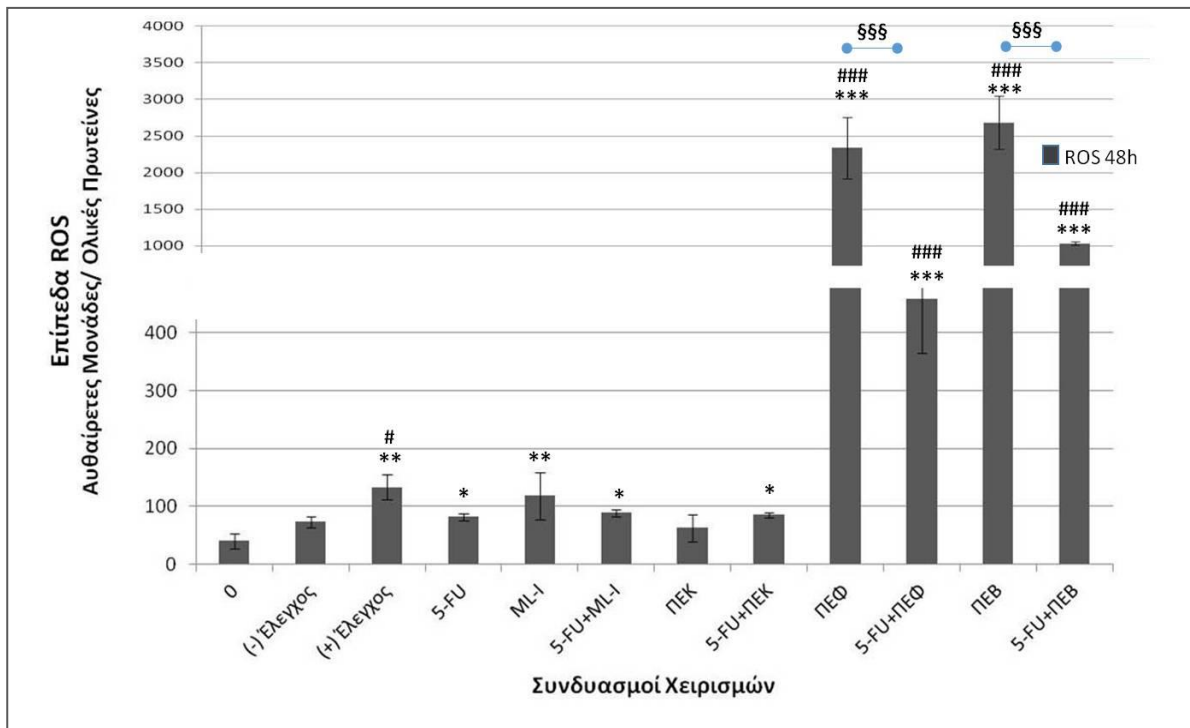
Η χρωστική διοξική 2,7-διχλωρο-διϋδροφλουορεσκεΐνη (DCFH-DA) χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης για το προσδιορισμό του σχηματισμού ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά HeLa, ως αποτέλεσμα της επίδρασης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς ιξού και της λεκτίνης ML-1. Οι πρωτεΐνες χορηγήθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-FU, για δύο χρονικές περιόδους επώασης για 24 και 48 ώρες, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT. Τα επίπεδα ROS εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μετρώντας την ένταση φθορισμού του ιχνηθέτη και στη συνέχεια κανονικοποιήθηκαν προς το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες (AM) που προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση των μετρήσεων φθορισμού των κυττάρων. Στην εικόνα 4-7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την επώαση 24 ωρών.



Εικόνα 4- 7 Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα HeLa μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p<0.05$, §§ $p<0.01$, §§§ $p<0.001$.

Ο αναστολέας βιοσύνθεσης ROS, N-ακετυλο-1-κυστεΐνη, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός έλεγχος (-) των μετρήσεων μετά από επώαση των κυττάρων με το παράγοντα σε συγκέντρωση 0,5 M (Halasi et al. 2013). Αντίστοιχα, 200 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) χρησιμοποιήθηκαν για τον θετικό έλεγχο (+) παραγωγής ROS από τα κύτταρα. Κατά την επώαση των κυττάρων με τους χειρισμούς για 24 ώρες παρατηρείται ότι τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων (253,78±34,9 AM) και βλαστών (178,70±33,55 AM) παρουσιάζουν έντονο σχηματισμό ROS, ενώ η λεκτίνη και τα εκχυλίσματα κάλλων δεν διαφοροποιούνται σε σχέση με τον μάρτυρα (0). Το φάρμακο 5-FU (82,04±16,12 AM), καθώς και ο συνδυασμός του με την λεκτίνη (130,07±20,49 AM) και τα εκχυλίσματα φύλλων (156,26±37,89 AM) και βλαστών (247,79±65,34 AM) ευνοεί το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου, αλλά μόνο ο συνδυασμός με λεκτίνη έχει σημαντικότερη επίδραση από ότι η επώαση με τα εκχυλίσματα μεμονωμένα.

Τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων με τους χειρισμούς για το χρονικό διάστημα 48 ωρών παρουσιάζονται στην εικόνα 4-8 που ακολουθεί.



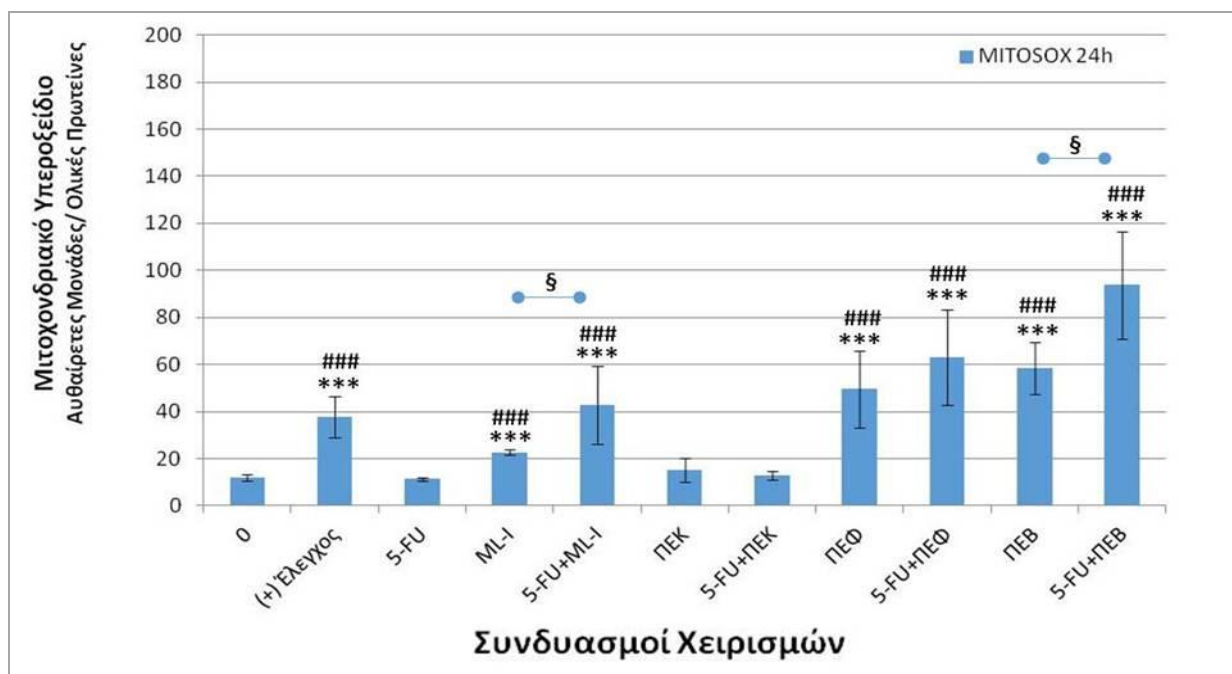
Εικόνα 4- 8: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα HeLa μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL PEK, 0.5 μg/mL PEΦ, 0.25 μg/mL PEΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48ωρών. (-) 0.5M N-αφετυλο-1-κυστεϊνη. (+) 200 μM H₂O₂. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαιρέτες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Κατά την επώαση των κυττάρων για 48 ώρες παρατηρείται ότι σε σχέση με το μάρτυρα τα εκχυλίσματα φύλλων (2336,13±421,49 AM) και βλαστών (2683,36±363,21 AM)

παρουσιάζουν πολύ σημαντική αύξηση στη παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενώ και η λεκτίνη (118,55±40,76 AM) δρα θετικά στο σχηματισμό τους. Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας 5-FU (82±6 AM) ευνοεί τη παραγωγή ROS όταν παρέχεται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες ιξού. Παρατηρείται, ότι ο συνδυασμός του φαρμάκου με τη λεκτίνη δεν διαφοροποιεί την επίδραση της πρωτεΐνης (89±6 AM), ενώ ο συνδυασμός του με το εκχύλισμα κάλων (83,5±4,91 AM) προκαλεί αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου σε σχέση με το εκχύλισμα μεμονωμένο. Η συγχορήγηση του φαρμάκου με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βλαστών (1031,43±23,25 AM) και φύλλων (459,21±94,78 AM) διεγείρει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα από τους αντίστοιχους χειρισμούς χωρίς την παρουσία 5-FU.

4.4. Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής μιτοχονδριακού ανιόντος του σουπεροξειδίου στη κυτταρική σειρά HeLa.

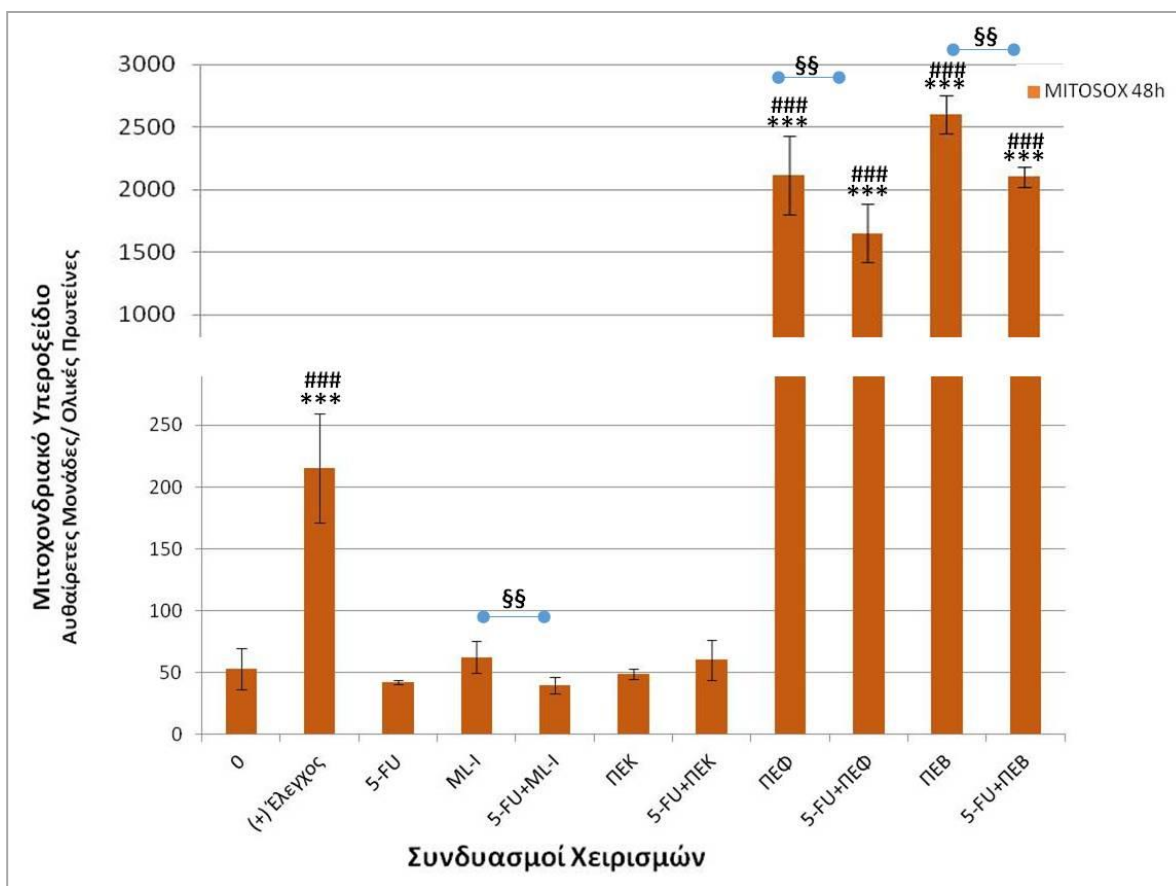
Η χρωστική MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) χρησιμοποιήθηκε για την φθορισμομετρική ανίχνευση της παραγωγής ανιόντος του σουπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια κυττάρων HeLa. Η χρωστική κατευθύνεται επιλεκτικά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, όπου οξειδώνεται παρουσία του ανιόντος του σουπεροξειδίου και φθορίζει (διέγερση 510nm-εκπομπή 580nm). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τη λεκτίνη ML-1 και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιξού, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-FU, για δύο χρονικές περιόδους, 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες (AM) που προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση των μετρήσεων του φθορισμού των κυττάρων προς το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο τους. Για τον θετικό έλεγχο (+) παραγωγής ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε αντιμυσίνη (antimycin-A) σε συγκέντρωση 50μM. Τα αποτελέσματα της μεταχείρισης των κυττάρων με τις πρωτεΐνες και το αντικαρκινικό φάρμακο για 24 ώρες παρουσιάζονται στην εικόνα 4-9.



Εικόνα 4- 9: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ανιόντος του σουπεροξειδίου (O_2^-) σε κύτταρα HeLa μετά την επώαση με 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ML-I, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΠΕΚ, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΠΕΦ, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. (+) 50 μM αντιμυσίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoSOX™ Red προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Κατά την επώαση των 24 ωρών παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα του κάλου δεν προκαλούν τον σχηματισμό ανιόντος του σουπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με τη λεκτίνη ($22,75 \pm 1,2$ AM) και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων ($49,67 \pm 16,35$ AM) και βλαστών ($58,33 \pm 11,13$ AM), τα οποία επάγουν σημαντική αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης ρίζας. Η μεμονωμένη χορήγηση 5-FU στα κύτταρα καθώς και ο συνδυασμός του με εκχυλίσματα κάλων δεν διαφοροποίησε την παραγωγή O_2^- σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ ο συνδυασμός του χημειοθεραπευτικού παράγοντα με εκχυλίσματα φύλλων ($63,06 \pm 20,34$ AM) επιδρά θετικά στην παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου, χωρίς όμως να διαφοροποιεί την επίδραση του μεμονωμένου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Η 5-FU ενισχύει την επίδραση της λεκτίνης ($49,67 \pm 16,35$ AM) και των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων βλαστών ($93,74 \pm 22,77$ AM) αυξάνοντας τα επίπεδα παραγωγής σουπεροξειδίου.

Τα αποτελέσματα της μεταχείρισης των κυττάρων με τις πρωτεΐνες και το αντικαρκινικό φάρμακο για 48 ώρες παρουσιάζονται στην εικόνα 4-10.

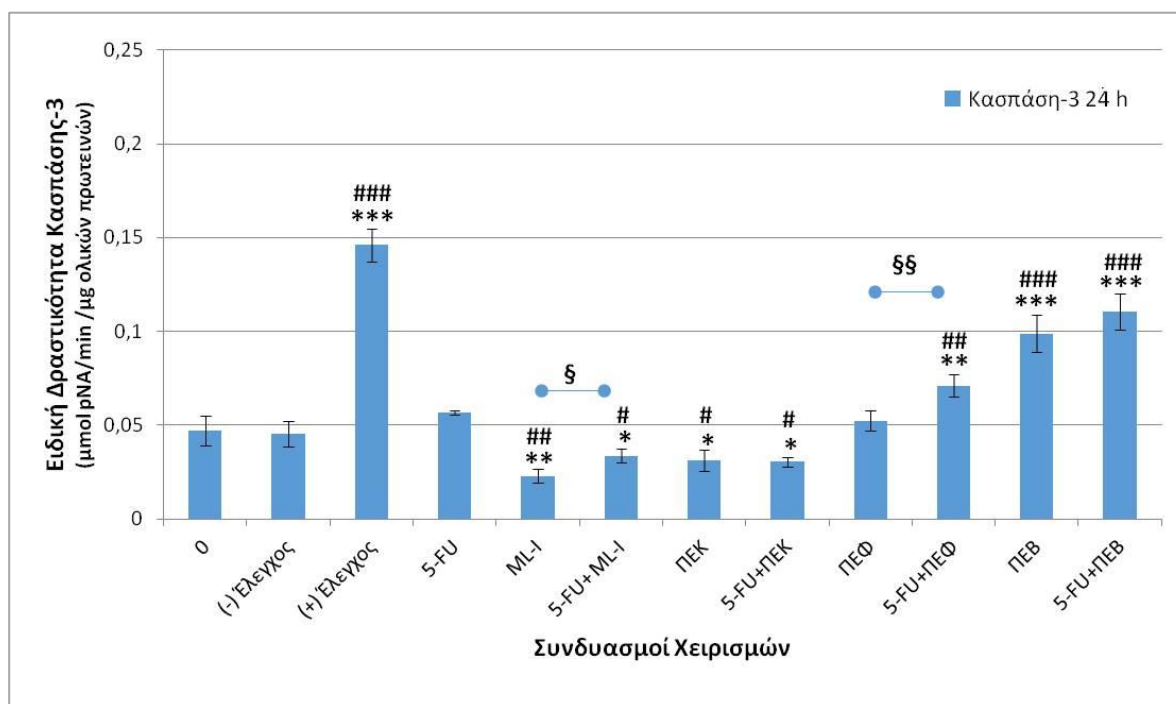


Εικόνα 4- 9:Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ανιόντος του σουπεροξειδίου(O₂⁻) σε κύτταρα HeLa μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. (+) 50μM αντιμυσίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού της χρωστικής MitoSOX™ Red προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § p<0.05, §§p<0.01, §§§p<0.001.

Η επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων (2116,15 ±315,41 AM) και βλαστών (2598,54±151,36 AM) ιξού επιδρά σημαντικά στην παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου. Η συγχορήγηση της 5-FU με τα εκχυλίσματα φύλλων (1651,72±233,68 AM) και βλαστών (2101,9±78,04 AM) προκαλεί υψηλά επίπεδα παραγωγής O₂⁻, αλλά σε χαμηλότερο επίπεδο από ότι τα εκχυλίσματα μεμονωμένα. Οι υπόλοιποι χειρισμοί με λεκτίνη, 5-FU και πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κάλων, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το φάρμακο, δεν επηρεάζουν τη παραγωγή σουπεροξειδίου.

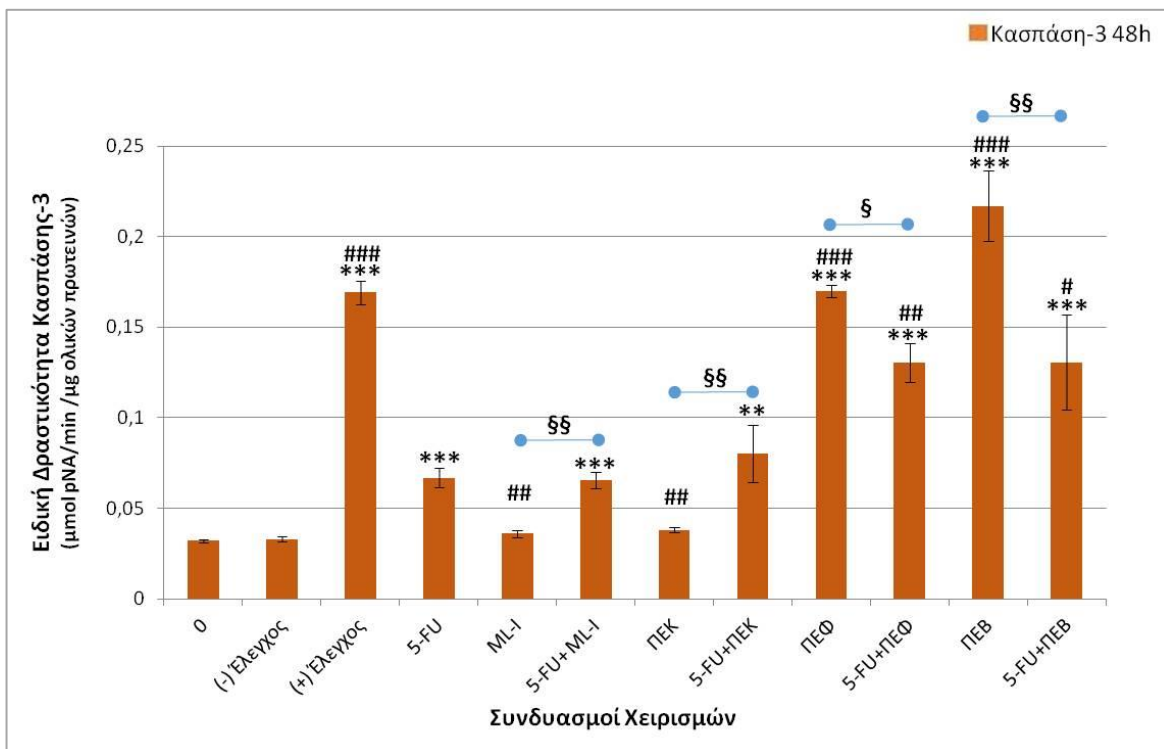
4.5. Επίδραση των χειρισμών στην ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3, στη κυτταρική σειρά HeLa.

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων HeLa για 24 και 48 ώρες με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ιστών ιζού και της λεκτίνης ML-I, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-FU, επιτυγχάνεται φωτομετρικά με τη χρήση του εξειδικευμένου κιτ caspase-3 assay kit Colorimetric (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S). Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης της πάρα-νιτροανιλίνης (p-NA), ένα χρωμοφόρο μόριο που απελευθερώνεται από το υπόστρωμα Ac-DEVD-pNA λόγω υδρόλυσης από την δράση της κασπάσης-3. Χρησιμοποιήθηκε δοξορουβικίνη (DOX) ως θετικός μάρτυρας και ο αναστολέας κασπάσης-3 Ac-DEVD-CHO (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al) ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης p-νιτροανιλίνης και κανονικοποιούνται ως προς τις ολικές πρωτεΐνες κάθε δείγματος. Η ενεργότητα της κασπάσης-3 εκφράζεται ως μολ p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζεται η επίδραση των χειρισμών για 24 ώρες (Εικόνα 4-11) και 48 ώρες (Εικόνα 4-12) στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3.



Εικόνα 4- 10: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων HeLa με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μολ p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § p<0.05, §§p<0.01, §§§p<0.001.

Η επώαση των κυττάρων για χρονικό διάστημα 24 ωρών με τις πρωτεΐνες ιξού παρουσιάζει διαφορετικά αποτελέσματα ανά χειρισμό. Η λεκτίνη και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάλλων προκάλεσαν μείωση των επιπέδων δραστηριότητας της κασπάσης ακόμα και όταν χορηγήθηκαν παράλληλα με τη 5-FU. Το εκχύλισμα φύλλων δεν επηρέασε την δράση του ενζύμου, αλλά όταν συνδυάστηκε με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα βλαστών προκάλεσε σημαντική αύξηση της ειδικής δραστηριότητας της κασπάσης ανεξάρτητα από τη παρουσία της 5-FU.



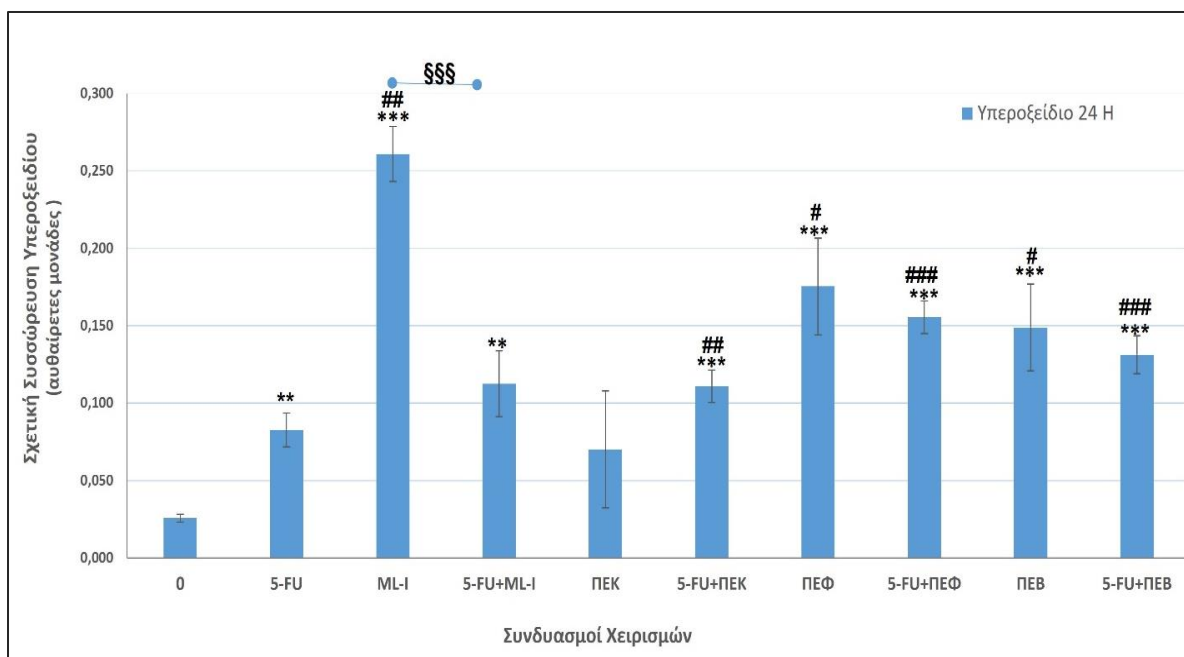
Εικόνα 4- 11: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων HeLa με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μmol p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Η επώαση των κυττάρων με τους διαφορετικούς χειρισμούς για χρονικό διάστημα 48 ωρών είχε διαφορετικά αποτελέσματα στα επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου. Παρατηρήθηκε ότι η λεκτίνη και τα εκχυλίσματα κάλλων δεν επηρέασαν το σχηματισμό της κασπάσης. Όταν χορηγήθηκαν παράλληλα με τη 5-FU, ο συνδυασμός δεν διαφοροποίησε την θετική επίδραση του φαρμάκου. Σε αντιδιαστολή, κατά την επώαση με εκχυλίσματα φύλλων και βλαστών η ενεργότητα της κασπάσης-3 που μετρήθηκε ήταν ιδιαίτερα υψηλή, αλλά ο συνδυασμός με 5-FU μετρίασε τα επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου.

4.6. Εκτίμηση της επίδρασης των χειρισμών στη παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου με χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα.

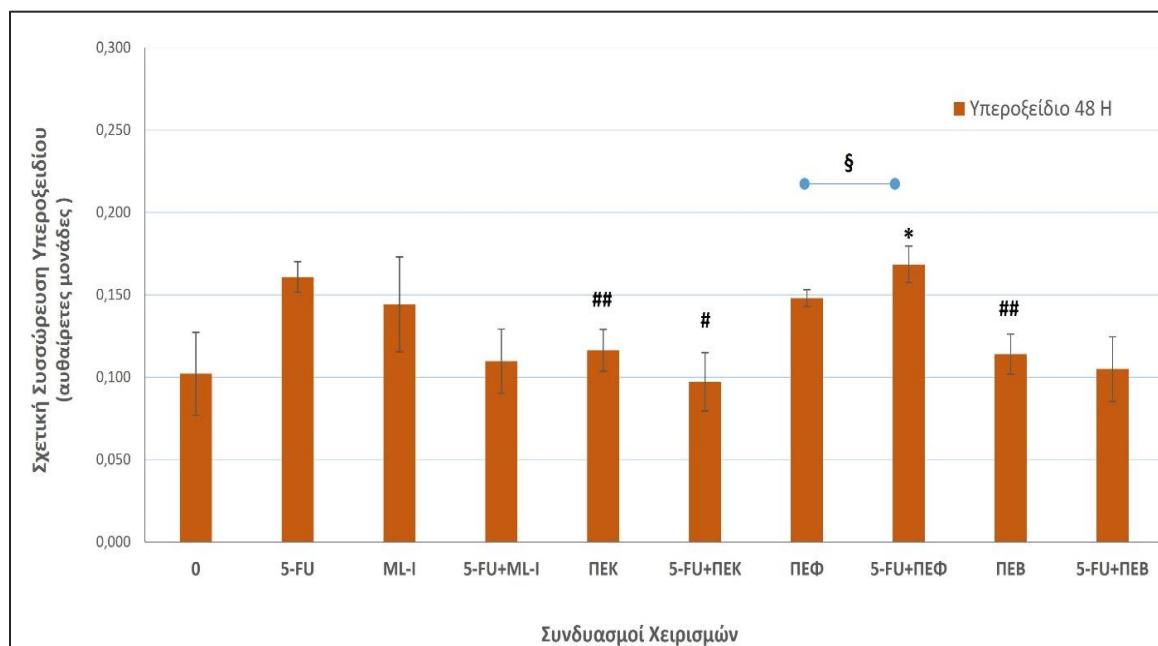
Τα επίπεδα συσσώρευσης ανιόντος του σουπεροξειδίου στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων HeLa, μετρήθηκαν με τη χρήση κυτταρικού βιοαισθητήρα. Σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου διαμέτρου 2 mm περιείχαν ακινητοποιημένα κύτταρα Vero, μεμβρανικά τροποποιημένα με το ενζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD), σε πληθυσμό 75×10^3 κύτταρα/σφαιρίδιο. Το ηλεκτρόδιο μέτρησης συνδεθηκε με σφαιρίδιο που περιέχει τα τροποποιημένα κύτταρα, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς με σφαιρίδιο χωρίς κύτταρα. Σε κάθε μέτρηση το συστημα του βιοαισθητήρα, βυθίζοταν σε φρεατίο που περιείχε κύτταρα HeLa με 150 μ L διαλύματος κάθε χειρισμού. Κάθε μέτρηση αντιστοιχεί στον μέσο όρο του δυναμικού των κυτταρικών μεμβρανών του αισθητήρα, που έχει βαθμονομηθεί ώστε να αντιστοιχεί σε σχετικές αλλαγές στη συγκέντρωση σουπεροξειδίου στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων.

Μετά την έκθεση των κυττάρων στους διάφορους χειρισμούς για χρονικό διάστημα 24 ωρών, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση σουπεροξειδίου στο θρεπτικό μέσο σε σχέση με το μάρτυρα, εκτός από την εφαρμογή εκχυλισμάτων κάλλου (Εικόνα 4-13). Η προσθήκη καθαρής λεκτίνης ML-I παρουσίασε τη μεγαλύτερη απελευθέρωση σουπεροξειδίου στο μέσο καλλιέργειας ενώ ο συνδυασμός της με τον αντικαρκινικό παράγοντα υποβάθμισε σημαντικά το φαινόμενο. Η 5-FU επιδρά θετικά στην απελευθέρωση σουπεροξειδίου, αλλά μόνο ο συνδυασμός του με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κάλλων προκάλεσε αύξηση των επιπέδων σε σχέση με τη μεμονωμένη χορήγηση του φαρμάκου. Η συγχορήγηση της 5-FU με τα εκχυλίσματα βλαστών και φύλλων, δεν διαφοροποιεί τα επίπεδα σουπεροξειδίου σε σχέση με τα εκχυλίσματα μεμονωμένα.



Εικόνα 4- 12: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την σχετική συσσώρευση ανιόντος του σουπεροξειδίου στο θρεπτικό μέσο κατά την επώαση κυττάρων HeLa με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η απόκριση του βιοαισθητήρα (αυθαίρετες μονάδες). Οι μέσες τιμές± SD: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Αντίθετα, η επώαση των κυττάρων για 48 ώρες με τους χειρισμούς (Εικόνα 4-17), δεν παρουσιάζει διαφορές στην απελευθέρωση σουπεροξειδίου σε σχέση με το μάρτυρα, με εξαίρεση τον συνδυασμό της 5-FU με εκχυλισματα φύλλων.



Εικόνα 4- 13: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την σχετική συσσώρευση ανιόντος του σουπεροξειδίου στο θρεπτικό μέσο κατά την επώαση κυττάρων HeLa με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η απόκριση του βιοαισθητήρα (αυθαίρετες μονάδες). Οι μέσες τιμές± SD: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p<0.05$, §§ $p<0.01$, §§§ $p<0.001$.

4.7. Συμπεράσματα και συζήτηση.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις αντικαρκινικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού έχει παραμείνει σε υψηλά επίπεδα ιδιαίτερα κατά τη θεραπεία γυναικολογικών καρκίνων (Felenda et al. 2019, Freuding, Keinki, Micke, et al. 2019). Υπάρχουν πολλές μελέτες που επισημαίνουν την επίδραση των εκχυλισμάτων στη μείωση των παρενεργειών από τη χημειοθεραπεία, καθώς στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του όγκου σε καρκίνους των ωοθηκών (Hwang et al. 2019, Werthmann et al. 2018), του τραχήλου της μήτρας (Reynel et al. 2018), νευροβλάστωμα (Kaestner et al. 2019), γλοίωμα (Schötterl et al. 2018) και του πνεύμονα (Lee et al. 2019).

Η εφαρμογή εκχυλισμάτων γκι στη θεραπεία ασθενών με γυναικολογικούς καρκίνους είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα δεδομένου ότι αυτή η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών καταφεύγει συχνότερα σε συμπληρωματικές και εναλλακτικές ιατρικές προσεγγίσεις σε σύγκριση με ασθενείς που έχουν προσβληθεί από άλλους τύπους καρκίνου (Ben-Arye et al. 2012, Drozdoff et al. 2018). Οι κυτταροτοξικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες των λεκτινών, είτε σε καθαρή μορφή είτε ως μέρος εκχυλισμάτων, τεκμηριώνονται σε μελέτες *in vitro* και *in vivo* (Beuth et al. 1996, Jäggy et al. 1995) καθώς και σε 50 κλινικές δοκιμές (Anonymous 2019). Αν και εξακολουθούν να λείπουν εκτεταμένα στοιχεία σχετικά με την κλινική αποτελεσματικότητα του ιξού, παρασκευάσματα του φυτού έχουν ισχυρή επίδραση στη επίτευξη διαβίωσης των ασθενών μετά τη συμβατική χημειοθεραπεία (Hwang et al. 2019, Reynel et al. 2018). Στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, η θεραπεία με το εμπορικό εκχύλισμα γκι Iscador είχε θετική επίδραση στην επιβίωση των ατόμων που συμμετείχαν κλινική μελέτη (Grossarth-Maticek and Ziegler 2007). Από την άλλη, υπάρχουν αναφορές (Knöpfel-Sidler et al. 2005) ότι τα ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος του τραχήλου HELA-S3 ήταν τα λιγότερο ευαίσθητα μεταξύ μιας ομάδας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών στα οποία χορηγήθηκαν εκχυλίσματα ιξού. Γενικότερα, αν και ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τέταρτος πιο συχνός τύπος καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό, δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες για τη διερεύνηση των θεραπευτικών ιδιοτήτων εκχυλισμάτων του *Viscum album* (Freuding, Keinki, Micke, et al. 2019).

Η τυπική θεραπεία σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Eifel 2006b, Tangjitgamol et al. 2014), συνήθως βασίζεται σε σισπλατίνη, συχνά σε συνδυασμό με 5-FU (Eifel 2006a, Nosaka et al. 2016). Η χημειοθεραπεία είναι κρίσιμη για την

αντιμετώπιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, ωστόσο, η εφαρμογή της έχει σημαντικές προκλήσεις που σχετίζονται με ανεπιθύμητες παρενέργειες, μείωση της ποιότητας ζωής, υψηλό κόστος και ανθεκτικότητα στα φάρμακα ιδιαίτερα όταν περιλαμβάνεται η 5-FU (Likhacheva et al. 2013, Vishnoi et al. 2016). Η ταυτόχρονη εφαρμογή ενός παράγοντα που δρά ως τροποποιητής και/ή ενισχυτής της βιολογικής απόκρισης σε τυπικά σχήματα χημειοθεραπείας, θα μπορούσε να είναι μια σημαντική πρόοδος στη θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, καθώς θα μπορούσε να επιτρέψει την επίτευξη ενός μέγιστου αποτελέσματος σε χαμηλότερες, καλύτερα ανεκτές δόσεις των εν λόγω σκευασμάτων. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι, πέρα από τη δική τους κυτταροτοξική δράση στα κύτταρα HeLa, τα φυτικά εκχυλίσματα γκι μπορούν να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της 5-FU in vitro, ειδικά μετά από συνδυασμένη χορήγηση για 48 ώρες.

Από τις δοκιμές βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο MTT παρατηρείται ότι η καθαρή λεκτίνη ML-I και τα εκχυλίσματα του κάλλου αυξάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ οι πρωτεΐνες που προέρχονται από φύλλα και βλαστούς έδειξαν εξαιρετικά κυτταροτοξικά αποτελέσματα. Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε ενδεχομένως να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο *V. album ssp. abietis* προάγει τη βιοσύνθεση των λεκτινών ML-II και ML-III, οπότε τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των μητρικών ιστών έχουν διαφορετική συμπεριφορά από ότι η καθαρή λεκτίνη ML-I. Ο παρασιτισμός του γκι σε διαφορετικά είδη φυτών ξενιστών επηρεάζει σημαντικά τη βιοσύνθεση του δευτερογενών μεταβολιτών και τη συσσώρευση φαρμακευτικών ενώσεων (Ochocka and Piotrowski 2002) ιδιαίτερα η βιοσύνθεση ισομορφών λεκτινών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση ξενιστή-παρασίτου καθώς το *V. άλμπουμ* που αναπτύσσεται σε έλατα προτιμά την παραγωγή λεκτινών ML-II και ML-III ενώ ο παρασιτισμός σε φυλλοβόλα είδη προάγει τη βιοσύνθεση του ML-I (Bussing et al. 1997). Οι κυτταροτοξικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων πρωτεΐνης *Viscum album* L. εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε λεκτίνες γκι και η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην επίδραση κάθε μίας από τις λεκτίνες διαφέρει. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη ML-III ήταν η πιο κυτταροτοξική λεκτίνη σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων Molt 4, και μάλιστα σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις κάτω από το εύρος ng/mL (Frantz et al. 2000).

Οι αλληλεπιδράσεις παρασκευασμάτων γκι με 5-φθοροουρακίλη δεν έχουν δοκιμαστεί σε εκτεταμένο βαθμό. Στην in vitro μελέτη μας, η ML-I καθώς και τα εκχυλίσματα που προέρχονται από φύλλα και στελέχη ενίσχυσαν σημαντικά την κυτταροτοξική δράση της 5-FU, ειδικά στις 48 ώρες. Τα εμπορικά διαθέσιμα εκχυλίσματα γκι έχουν χορηγηθεί σε ασθενείς σε κλινικές δοκιμές ως επικουρικό στην τυπική χημειοθεραπεία 5-FU. Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 5-FU μετά από χειρουργική επέμβαση, μαζί με τα εκχυλίσματα γκι Helixor A και Iscador M Spez (Pelzer et al. 2018). Το εκχύλισμα *Abnoba-Viscum Quercus* χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμή φάσης II για τη ρύθμιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, που είχε ανθεκτικότητα στη φθοριοουρακίλη (Bar-Sela and Haim 2004). Η

συμπληρωματική θεραπεία με παρασκευάσματα V. άλμπουμ έδειξε σημαντικές επιδράσεις στη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς αλλά όχι κυτταροτοξικές επιδράσεις στους όγκους.

Τα εκχυλίσματα που προέρχονται από φύλλα και βλαστικά στελέχη εμφάνισαν τοξικές επιδράσεις έναντι των κυττάρων HeLa προκαλώντας την ενεργοποίηση αποπτωτικών κασπάσων και σχηματισμό ROS. Το οξειδωτικό στρες, καθώς και η ενεργοποίηση της κασπάσης, εμπλέκονται ενεργά στην επαγωγή απόπτωσης (Halliwell 2011). Η κασπάση-9 και η κασπάση-8 εμπλέκονται στα μονοπάτια των μιτοχονδριακών και των υποδοχέων του θανάτου, αντίστοιχα, τα οποία ενεργοποιούν την κασπάση-3 για να προκαλέσουν απόπτωση (Brentnall et al. 2013). Σε αυτή τη μελέτη, οι πρωτείνες παρατηρήθηκαν να ενεργοποιούν την κασπάση-3 ενώ παρουσίασαν υψηλά επίπεδα ROS. Έχουν αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί απόπτωσης που προκαλούνται από τις λεκτίνες γκί, μπορεί να είναι εξαρτώμενοι από τις ROS (Lyu et al. 2002), καθώς και μηχανισμοί ανεξάρτητοι από την πρόκληση ελευθέρων ριζών, που ενεργοποιούνται κυρίως κατά τηνεπώαση με την ML-I (Lavastre et al. 2002). Η λεκτίνη ML-I ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω διαφόρων οδών, όπως η επαγωγή TNF-άλφα, καθώς και πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, Bax και Bak, στα μιτοχόνδρια (Fu et al. 2011). Η απόπτωση σχετίζεται στενά με δύο μονοπάτια, την ενδογενή (μιτοχονδριακή) και την εξωγενή οδό. Έχει αποδειχθεί ότι η επαγόμενη από ML-I απόπτωση των ανθρώπινων λευκοκυττάρων προκαλείται μέσω της μιτοχονδριακής ενδογενούς οδού κασπάσης (Bantel et al. 1999). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ανάλογα αποτελέσματα μεταξύ της παραγωγής μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου και της ενεργοποίησης της κασπάσης-3. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική κυτταρική πηγή δημιουργίας ελευθέρων ριζών μέσα στα κύτταρα, τα οποία χρησιμεύουν ως επαγωγικά σήματα για απόπτωση (Wang and Youle 2009). Αυτή η σχέση επιβεβαιώνεται από τη ανάλογη πορεία άυξης του σχηματισμού ROS και των αποτελεσμάτων MITOSOX τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Η δημιουργία ROS συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου και στην αντίσταση στη θεραπεία, επομένως η στοχευμένη διακοπή της επικοινωνίας οξειδοαναγωγής από μιτοχόνδρια προς κύτταρα αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη οδό για μελλοντική θεραπεία (D'Autréaux and Toledano 2007, Sullivan and Chandel 2014).

Η ανάπτυξη του κυτταρικού βιοαισθητήρα για την παρακολούθηση των επιπέδων του ανιόντος του σουπεροξειδίου στο μέσο καλλιέργειας, ανέδειξε ότι κατά την επώαση για 24 ώρες τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από το βιοαισθητήρα είναι ανάλογα με αυτά του μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου. Η παρακολούθηση της κυτταρικής καλλιέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανταπόκριση σε διαφορετικές επιλογές χημειοθεραπείας. Η χρήση βιοαισθητήρων, ιδιαίτερα βιοηλεκτρικών και ηλεκτροχημικών αισθητήρων στην ανάλυση αντινεοπλασματικών φαρμάκων αποκτά μεγαλύτερη σημασία τα τελευταία χρόνια (Lima et al. 2018, Meneghello et al. 2018). Σε αυτό το πλαίσιο, ένας κρίσιμος δείκτης για την παρακολούθηση της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων σε έναν κυτταρικό πληθυσμό είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου, το οποίο παράγεται κυρίως ως υποπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων,

απελευθερώνεται στη μιτοχονδριακή μήτρα, όπου μετατρέπεται αμέσως σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το μιτοχονδριακό υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί στη συνέχεια να διαχυθεί στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και να αντιδράσει με άλλα είδη ελεύθερων ριζών, να ρυθμίσει τις οδούς σηματοδότησης ή να προκαλέσει κυτταρική βλάβη (Suski et al. 2012). Ωστόσο, τα δεδομένα συγκέντρωσης σουπεροξειδίου που καταγράφονται με τον κυτταρικό βιοαισθητήρα θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του MITOSOX, καθώς το σουπεροξείδιο που προσδιορίστηκε με τον βιοαισθητήρα εκλούστηκε στο μέσο καλλιέργειας και όχι η πραγματική ενδοκυτταρική του συγκέντρωση (Crowe et al. 2019).

5. Εκτίμηση της επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, της λεκτίνης ML-I, και του αντικαρκινικού φαρμάκου 5-φθοριοουρακίλη (5FU), μεμονωμένα ή σε συνδυασμό τους, σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 και MDA-MB-231.

5.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτων σε παγκόσμια κλίμακα και η αντιμετώπιση του είναι μια μεγάλη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. Μέχρι σήμερα οι θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν θεραπευτικά σχήματα όπως χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Σκοπός της έρευνας είναι η αντιμετώπιση ανεπιθύμητων επιπτώσεων των φαρμακευτικών προσεγγίσεων και την βελτίωση της αποτελεσματικότητας τους. Ο ιξός είναι ένα φαρμακευτικό φυτό με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες και αποτελεί βασικό στοιχείο έρευνας για την χρήση του κατά τη συμπληρωματική θεραπεία έναντι των νεοπλασιών. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες για την αντικαρκινική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων του *Viscum album L.* σε γυναικολογικούς τύπους (Staube et al. 2023, Schad and Thronicke 2023, Freuding, Keinki, Kutschan, et al. 2019). Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο τύπο στον γυναικείο πληθυσμό, και ανήκει στις πρώτες επιλογές για τη μελέτη της δράσης των εκχυλισμάτων του ιξού. Τα εκχυλίσματα γκι μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής ασθενών με γυναικολογικό καρκίνο, συμβάλουν στην αύξηση των πιθανοτήτων επιβίωσης και οι παρενέργειες από το σχήμα περιγράφονται ως ελάχιστες και συνήθως σχετίζονται με αίσθημα κόπωσης (Staube et al. 2023).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετώνται οι κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος μαστού MCF7 και MDA-MB-231. Η πρώτη σειρά ανήκει στην κατηγορία των τριπλών θετικά καρκινικών σειρών, ενώ η δεύτερη σε εκείνη των τριπλών αρνητικά. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να εκφράζουν τον υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor, ER), τον υποδοχέα της προγεστερόνης (progesterone receptor, PR) και τον υποδοχέα τύπου 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) (Nehdi et al. 2019). Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από σωμακλωνικούς κάλους, φύλλα και βλαστούς ιξού (*Viscum album ssp. abietis*) καθώς και η καθαρή λεκτίνη ιξού ML-I, χορηγήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα μαστού, στις καρκινικές σειρές MCF7 και MDA-MB-231. Οι πρωτεΐνες χορηγήθηκαν είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο 5-fluorouracil (5-FU), ώστε να διερευνηθούν πιθανές συνεργιστικές δράσεις με το φάρμακο. Εκτιμήθηκε η επίδραση των χειρισμών στη κυτταρική βιωσιμότητα, στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών στα κύτταρα και στα επίπεδα σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Αρχικά ο προσδιορισμός της μιτοχονδριακής δραστηριότητας με την μέθοδο MTT, αποτελεί δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η αναστολή του

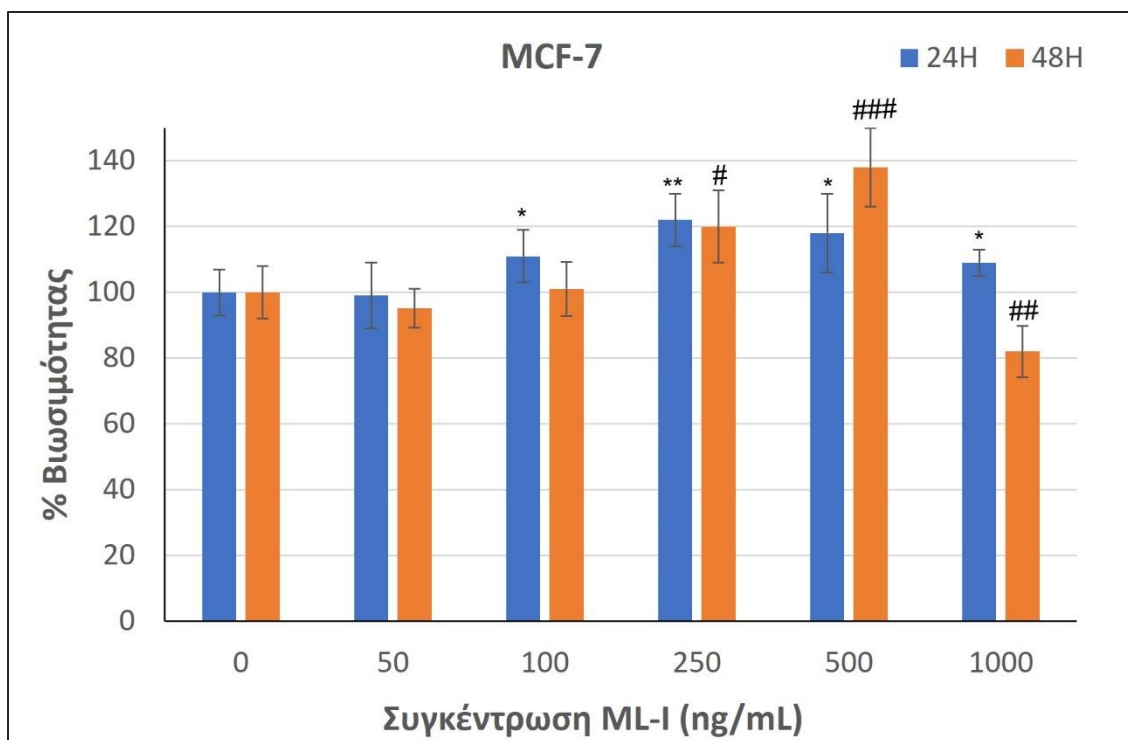
πολλαπλασιασμού των κυττάρων οφείλεται στην παρουσία οξειδωτικού στρες, οπότε υπολογίστηκαν φθορισμομετρικά τα επίπεδα ROS. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν διπλό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, καθώς σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα ενεργούν ως μετατροπείς σήματος για να ενεργοποιήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, και την αγγειογένεση. Όμως σε υψηλά επίπεδα προκαλούν σημαντικές βλάβες σε βιομόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, μεμβράνες καθώς και σε οργανίδια, οδηγώντας ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο (Nakamura and Takada 2021). Σε τελικό στάδιο για να διευκρινιστεί εάν η παρατηρούμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας αποδίδεται στην ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της κασπάσης-3, ενός ενζύμου με κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

5.2. Αξιολόγηση της επίδρασης των χειρισμών στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231 τη μέθοδο MTT.

Ο προσδιορισμός της επίδρασης των εκχυλισμάτων ιξού, της καθαρής λεκτίνης ML-1 και της 5-φθοριουρακίλης στη κυτταρική βιωσιμότητα πραγματοποιείται με τη μέθοδο MTT. Υπολογίζεται η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, η οποία συσχετίζεται με τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Η αναγωγή της χρωστικής MTT στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, λόγω ενζυμικής δραστηριότητας, προκαλεί τον σχηματισμό ενός έγχρωμου προϊόντος, που μπορεί να μετρηθεί με φωτόμετρο. Τα κύτταρα επωάζονται παρουσία κατάλληλων συγκεντρώσεων των χειρισμών για 24 και 48 ώρες και τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας.

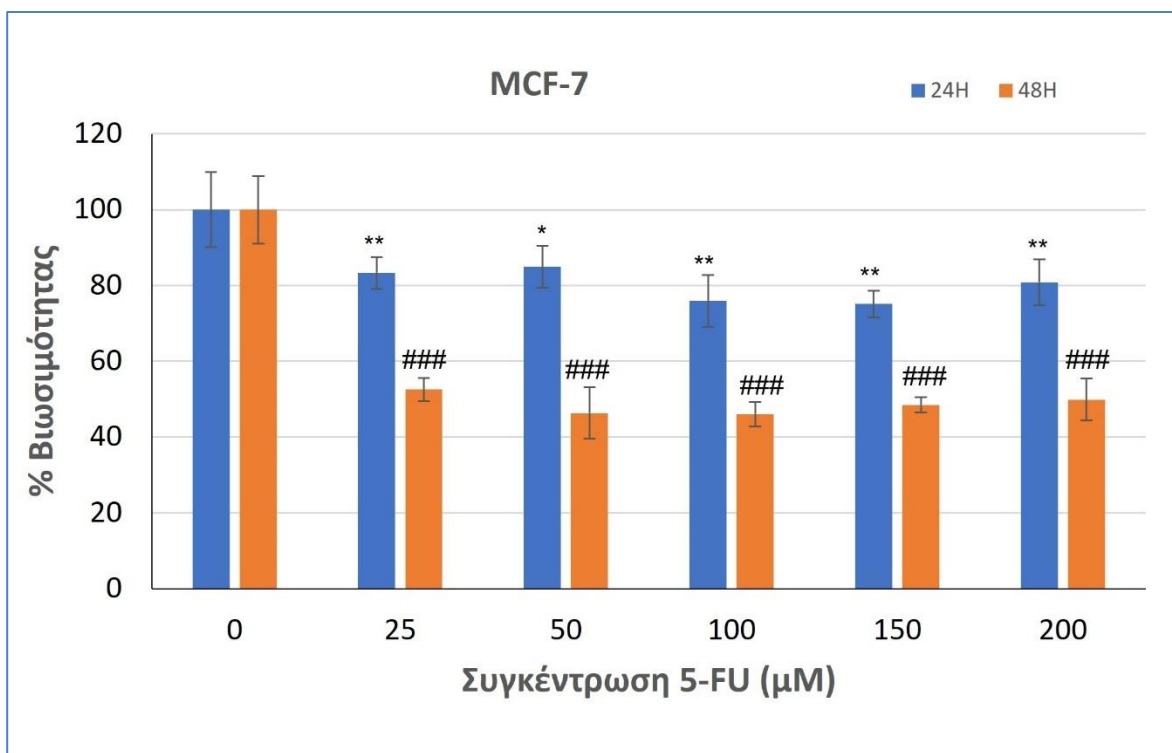
5.2.1. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7.

Τα κύτταρα επώαση με τη λεκτίνη ML-I, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (50-1000 ng/mL) για 2 χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών. Στην εικόνα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της λεκτίνης στην βιωσιμότητα του πληθυσμού. Δεν παρατηρείται κυτταροτοξικότητα κατά την επώαση για χρονικό διάστημα 24 ωρών, ενώ σε συγκεντρώσεις 100-1000 ng/mL εμφανίζεται αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Η επώαση των κυττάρων με αντίστοιχες συγκεντρώσεις για 48 ώρες, προκαλεί αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα στις δοσολογίες 250 και 500 ng/mL, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση (1000 ng/mL) προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού στο $82 \pm 7,8\%$, σε σχέση με το μάρτυρα.



Εικόνα 5- 1: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7 μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης ML-I (50, 100, 250, 500 και 1000 ng/mL) για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα (0) με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,### $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h

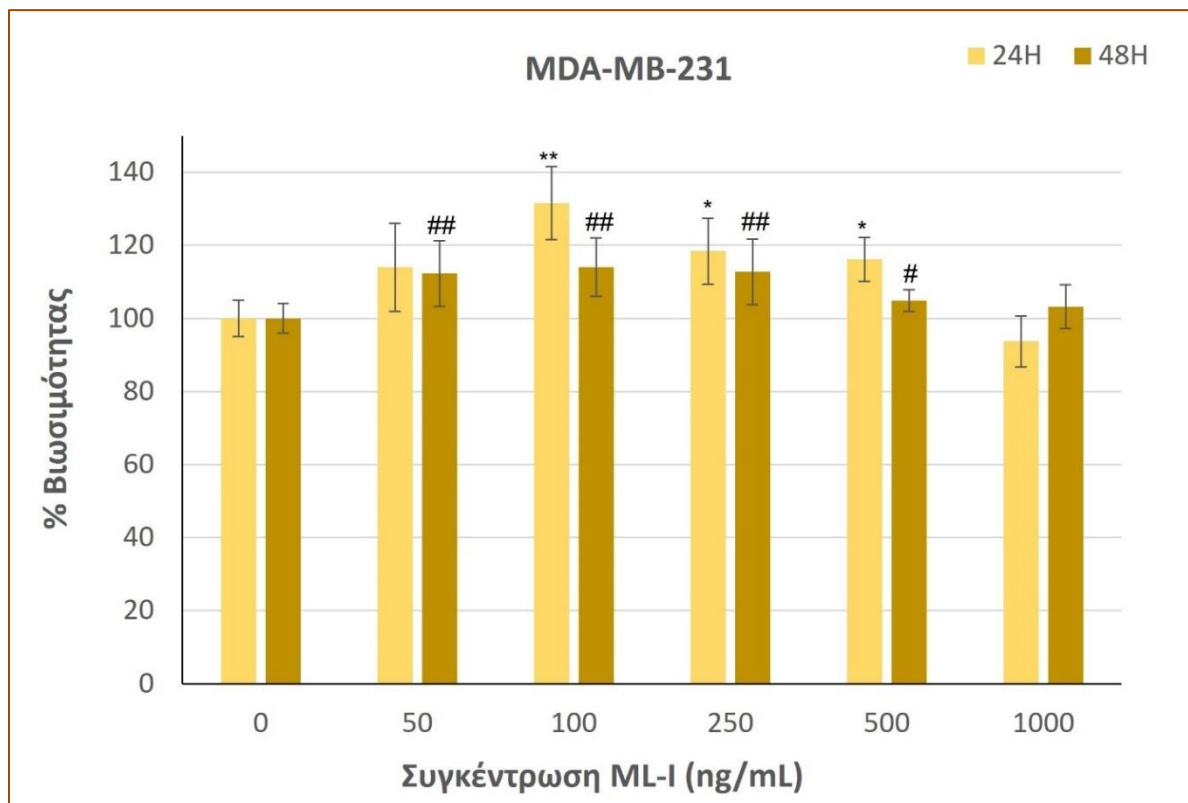
Η επίδραση της 5-φθοριοουρακίλης μελετάται κατά την επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις (25-200 μ M) για 24 και 48 ώρες, και παρουσιάζεται στην εικόνα 5.2. Κατά την 24ωρη επώαση παρατηρείται ότι η κυτταρική βιωσιμότητα μειώνεται, φθάνοντας το $75 \pm 6,8\%$ σε συγκέντρωση 150 μ M. Παράλληλα, η 48ωρη επώαση των κυττάρων οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων, η μικρότερη δόση (25 μ M) έχει ποσοστό βιωσιμότητας $52,5 \pm 3,1\%$, η οποία υπό την επίδραση συγκέντρωσης 100 μ M φθάνει στο $46,05 \pm 3,2\%$.



Εικόνα 5- 2: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7 μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του φαρμάκου 5-FU (5, 10, 25, 50, 100, 150 και 200 μM) για 24 & 48 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,### $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

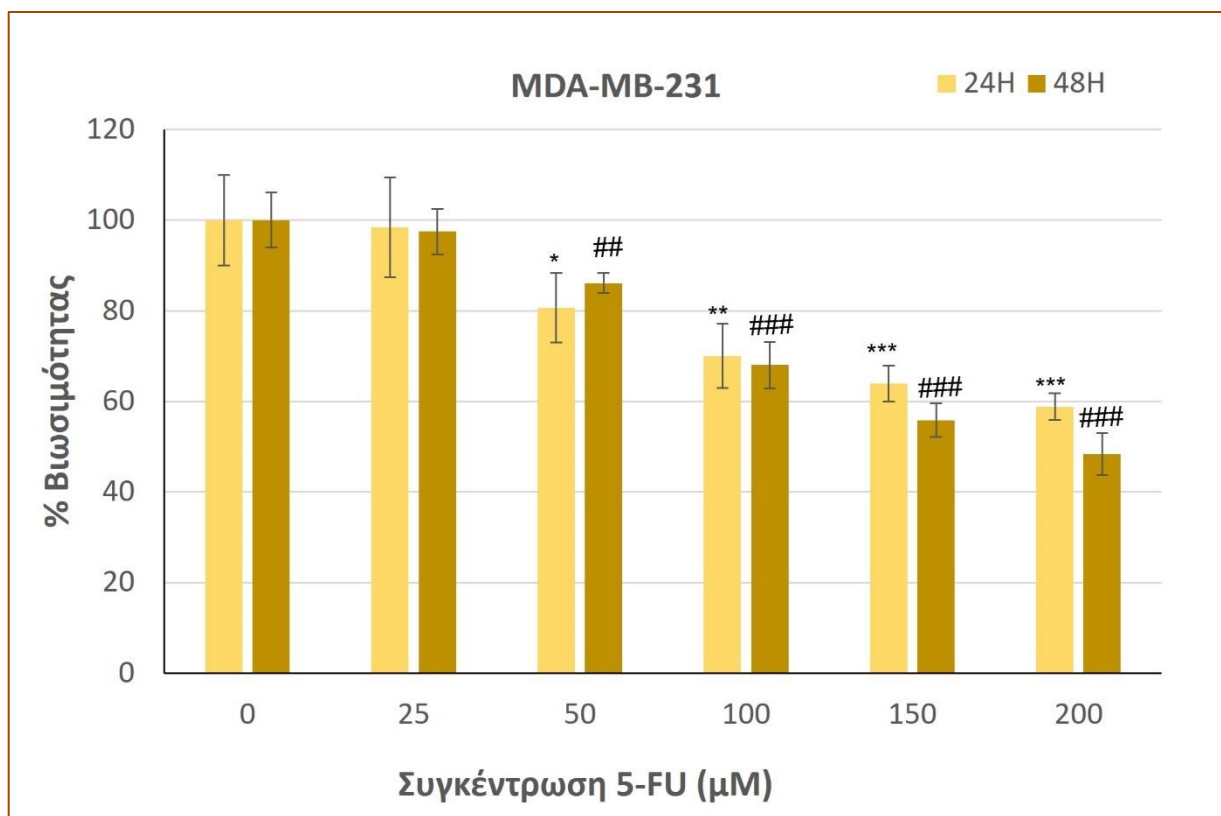
5.2.2. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ML-1 και 5-FU στη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231

Η επώαση της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231 με τη λεκτίνη ML-I δεν προκάλεσε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης (50-1000 ng/mL) για 2 χρονικά διαστήματα 24 και 48 ωρών, και παρατηρήθηκε αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα τόσο στην εικοσιτετράωρη επώαση σε δοσολογία 100-500 ng/mL, όσο και κατά την σαρανταοκτάωρη μεταχείριση με τη λεκτίνη σε συγκεντρώσεις 50-500 ng/mL (Εικόνα 5-3).



Εικόνα 5- 3: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231 μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης ML-I (50, 100, 250, 500 και 1000 ng/mL) για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα (0) με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,## $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h

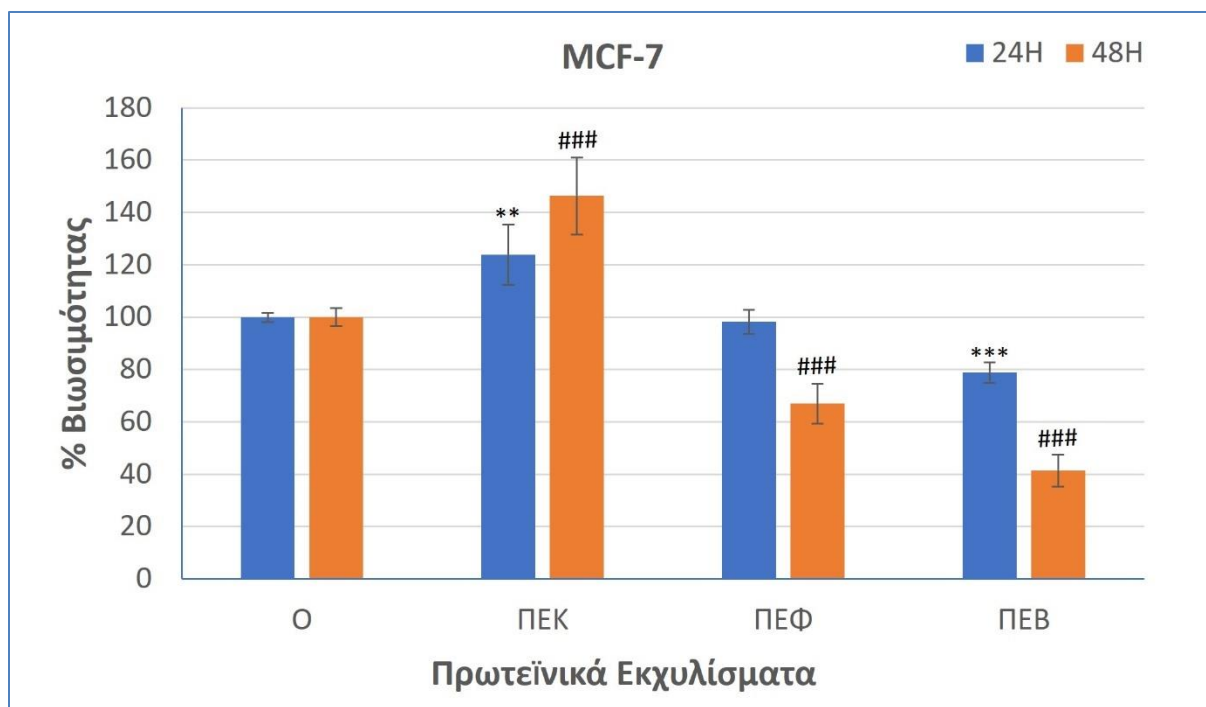
Στην εικόνα 5-4 απεικονίζεται η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του 5FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων MDA-MB-231, έπειτα από 24ωρη και 48ωρη επώαση. Στατιστικά σημαντική μείωση του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων εντοπίζεται κατά την εφαρμογή της 5FU σε συγκέντρωση μεγαλύτερη ή ίση των 50 μ M. Το μεγαλύτερο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα παρατηρείται σε συγκέντρωση 200 μ M, όπου η βιωσιμότητα αγγίζει το $58,80 \pm 2,95\%$ και το $48,37 \pm 4,6\%$, μετά τη 24ωρη και τη 48ωρη επώαση αντίστοιχα.



Εικόνα 5- 4: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231 μετά από επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του φαρμάκου 5-FU (5, 10, 25, 50, 100, 150 και 200 μΜ) για 24 & 48 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.01$, ***, ### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

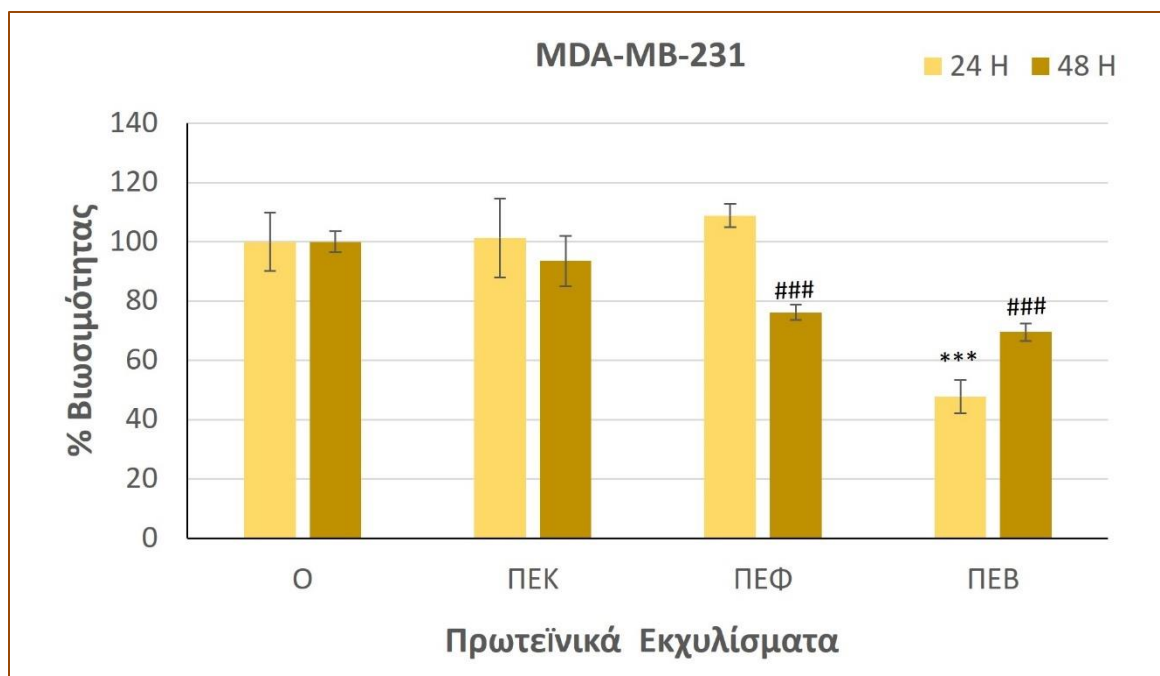
5.2.3. Επίδραση των εκχυλισμάτων ιξού στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 και MDA-MB-231.

Τα πρωτεϊνικά εκφυλίσματα κάλλων (ΠΕΚ) και φύλλων (ΠΕΦ) εφαρμοστήκαν στις κυτταρικές σειρές σε συγκέντρωση 500 ng/mL, ως συγκέντρωση αναφοράς. Σε προκαταρκτικά πειράματα τα εκχυλίσματα βλαστών παρουσίασαν πολύ μεγάλη κυτταροτοξικότητα και προτιμήθηκε να εφαρμόζεται μικρότερη συγκέντρωση (250 ng/mL) ώστε να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Η επίδραση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των καρκινικών κύτταρων αξιολογήθηκε με τη μέθοδο MTT σε δύο χρονικά διαστήματα επώασης, 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού στη κυτταρική σειρά MCF-7, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-5.



Εικόνα 5- 5: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7 μετά από επίδραση διαφορετικών διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού για 24&48 και ώρες. ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (500 ng/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (500 ng/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (250 ng/mL). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,### $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού στη κυτταρική σειρά MDA-MB-231, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-6. Στη κύτταρα, κατά την επώαση για 24 ώρες, μόνο το εκχύλισμα των βλαστών μείωσε τη βιωσιμότητα σε $78,85 \pm 3,8\%$. Κατά τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια επώασης, το εκχύλισμα φύλλων είχε βιωσιμότητα $66,91 \pm 7,5\%$ ενώ των βλαστών $41,45 \pm 6,09\%$. Τα εκχυλίσματα των κάλων δεν είχαν τοξική επίδραση σε καμία σειρά και στα MCF-7 παρουσίασαν αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα.

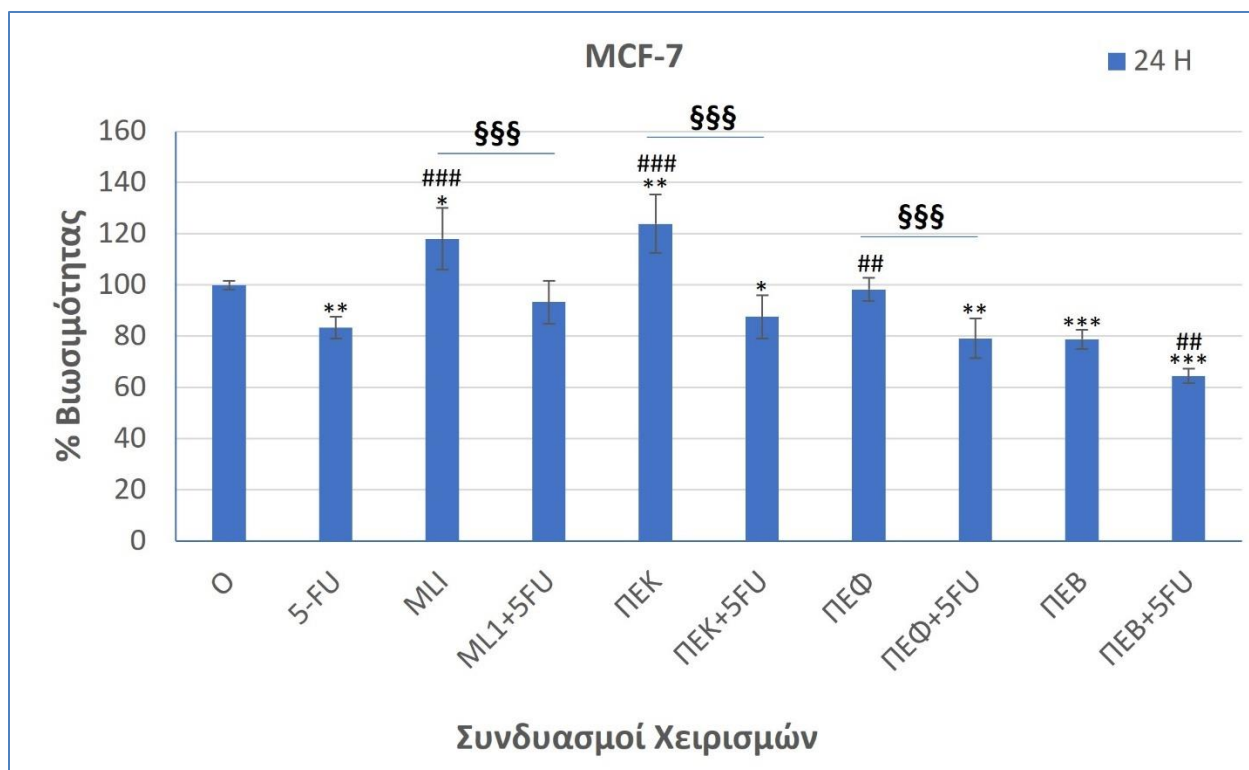


Εικόνα 5- 6: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231 μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού για 24&48 και ώρες. ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (500 ng/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (500 ng/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (250 ng/mL). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας *,# $p < 0.05$, **,### $p < 0.01$, ***,### $p < 0.001$, * για 24 h και # για 48h επώαση.

5.2.4. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7.

Η βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού MCF-7 διαφοροποιείται μετά τη χορήγηση της λεκτίνης, της 5-FU και των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ανάλογα με τη δόση και το χρόνο επώασης. Το επόμενο στάδιο είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης του χημειοθεραπευτικού παράγοντα με τις πρωτεΐνες του ιξού, όταν χορηγούνται συνδυαστικά σε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού MCF-7. Για τη διερεύνηση της συνδυαστικής δράσης του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες ιξού επώαστηκαν κύτταρα υπό την επίδραση σταθερής δόσης 5-φθοροουρακίλης (25 μ M) μαζί με λεκτίνη ML-I σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάλων και φύλλων σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστών σε συγκέντρωση 250 ng/mL.

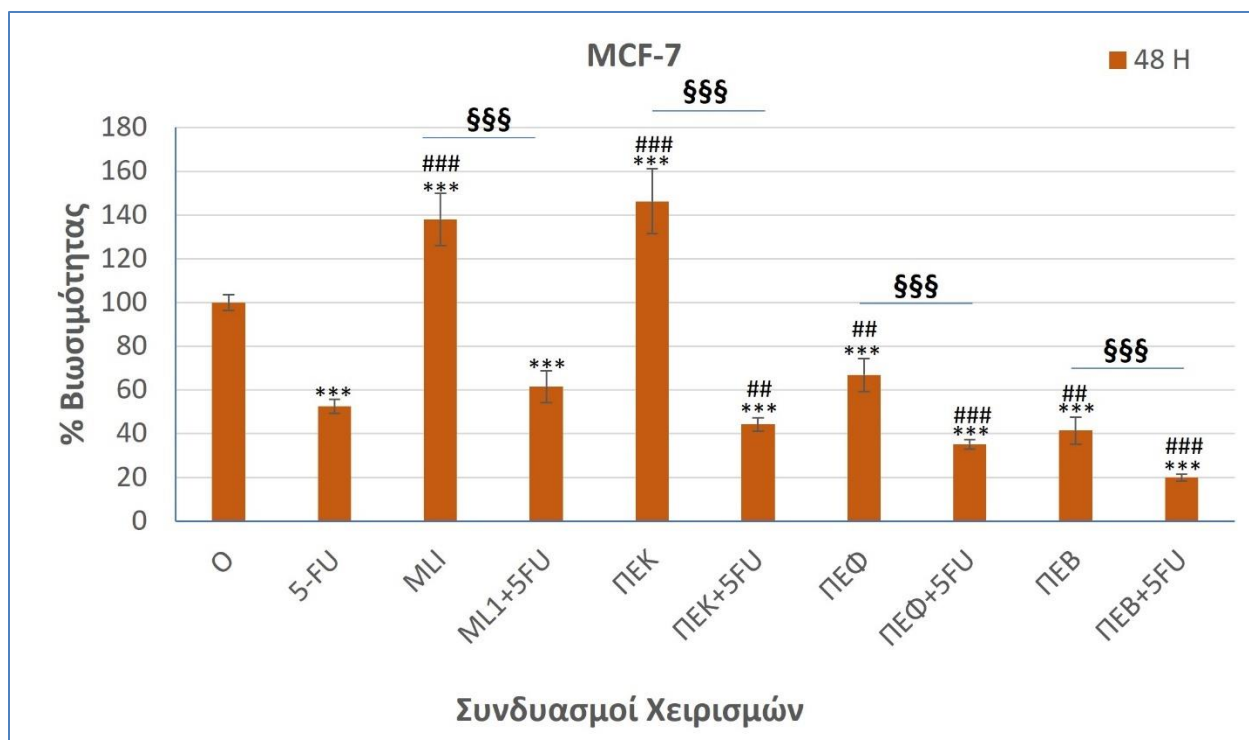
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ιξού σε συνδυασμό με τη 5-FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετά από επώαση 24 ωρών, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-7.



Εικόνα 5- 7. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για 24 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 µg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 µg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 µg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 µg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (25 µM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με ± % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

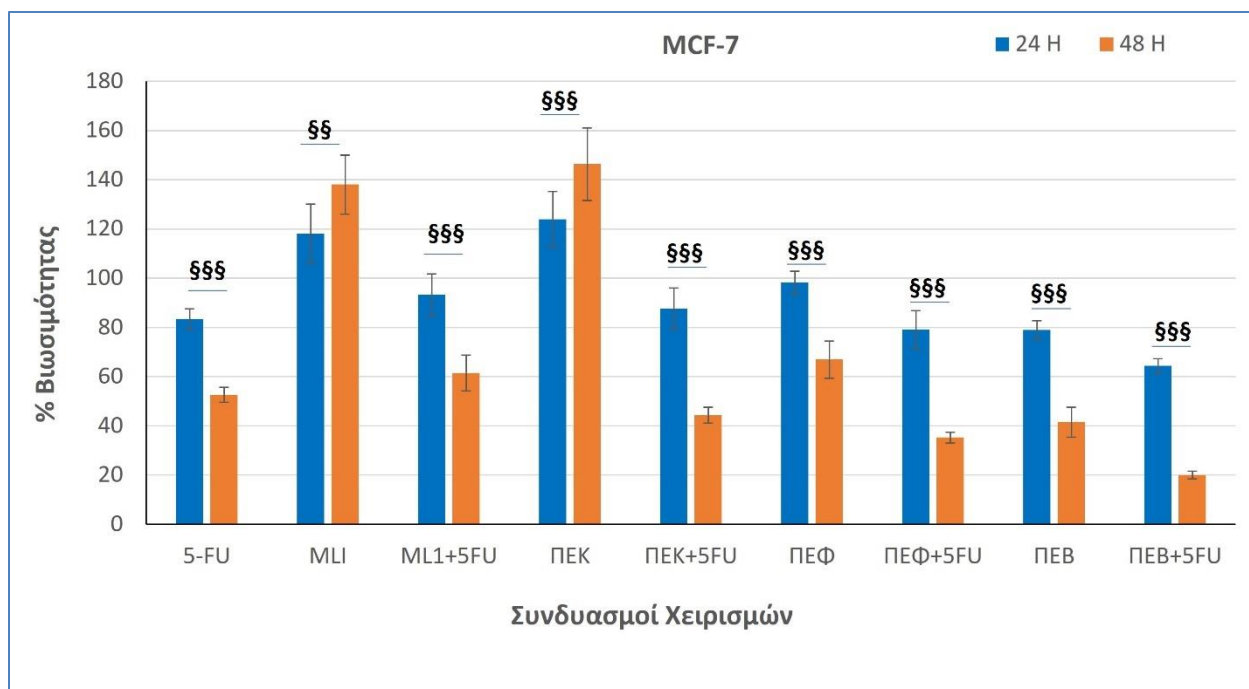
Παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά συγχορήγηση του φαρμάκου με τη λεκτίνη (93,26±8,49%) και τις πρωτεΐνες ιξού από κάλο (87,63±8,39%) και φύλλα (79,09±7,75%), δεν έχει διαφορετική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων από αυτή της μεμονωμένης χορήγησης του φαρμάκου (83,31±4,26%). Μόνο κατά τη συγχορήγηση με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βλαστών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας (64,39±2,83%).

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ιξού σε συνδυασμό με τη 5-FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετά από επώαση 48 ωρών, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-8. Παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά συγχορήγηση του φαρμάκου με τη λεκτίνη (61.45±7.25%) δεν διαφοροποιείται σε σχέση με τη μεμονωμένη επίδραση της 5-FU. Αντίθετα η μεγαλύτερη διάρκεια επώασης των εκχυλισμάτων με το φάρμακο αυξάνει σημαντικά την επίδραση τους στο κυτταρικό πληθυσμό σε επίπεδα κάτω από 50% (ΠΕΚ+5-FU: 44,25±3,15%. ΠΕΦ+5-FU: 35,2±2,23%, ΠΕΒ+5-FU: 19,92±1,62%).



Εικόνα 5- 8. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για 48 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (25 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Η επίδραση του χρόνου επώασης παρουσιάζεται στην εικόνα 5-9. Η μεμονωμένη χορήγηση λεκτίνης και εκχυλίσματος κάλων, προκαλεί αύξηση του μιτοχονδρικού μεταβολισμού, όσο αυξάνει ο χρόνος επώασης. Όλοι οι άλλοι χειρισμοί εμφανίζουν μειωμένη βιωσιμότητα όσο μεγαλύτερο είναι το διάστημα χορήγησης.



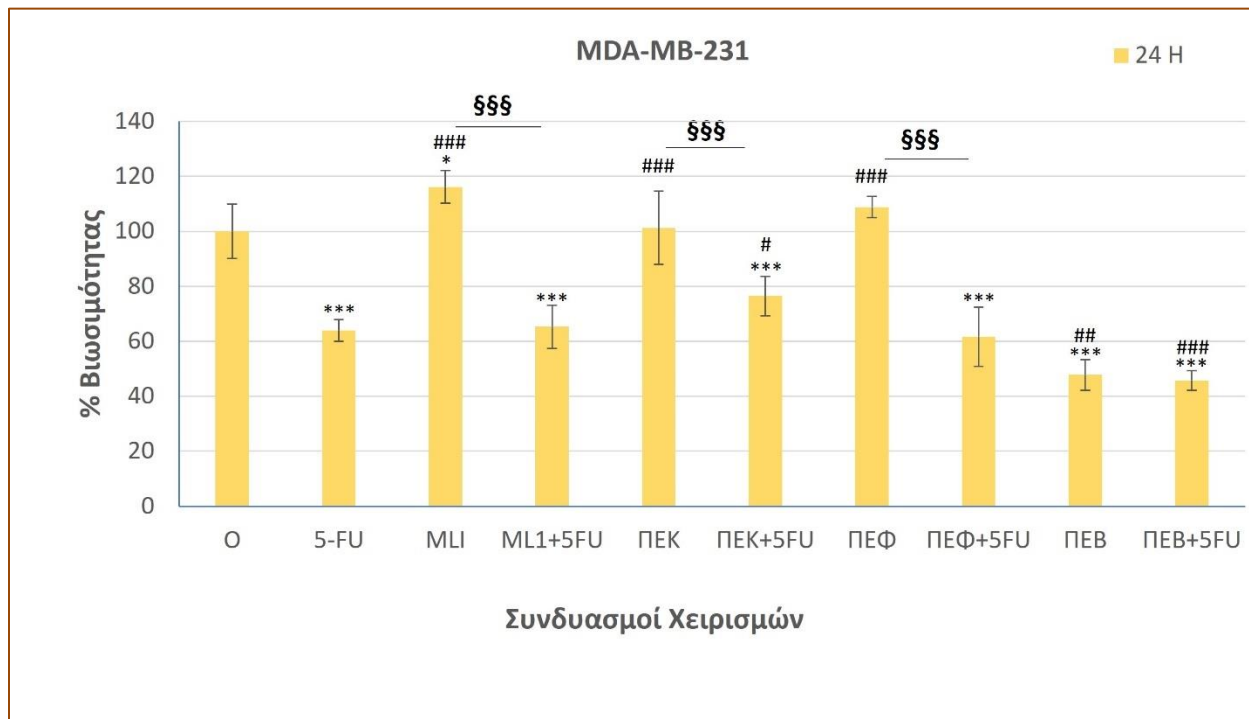
Εικόνα 5- 9. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MCF-7, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5- φθοροουρακίλη για 24 και 48 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (25 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με ± % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$

5.2.5. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στη βιωσιμότητα των κυττάρων MDA-MB-231.

Οι πρωτεΐνες επηρεάζουν τη κυτταρική βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231. Για τη διερεύνηση της συνδυαστικής δράσης της 5-FU με τις πρωτεΐνες ιξού επώαση κύτταρα υπό την επίδραση σταθερής δόσης 5-φθοροουρακίλης (150μM) μαζί με λεκτίνη ML-I σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάλων και φύλλων σε συγκέντρωση 500ng/mL ή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστών σε συγκέντρωση 250 ng/mL.

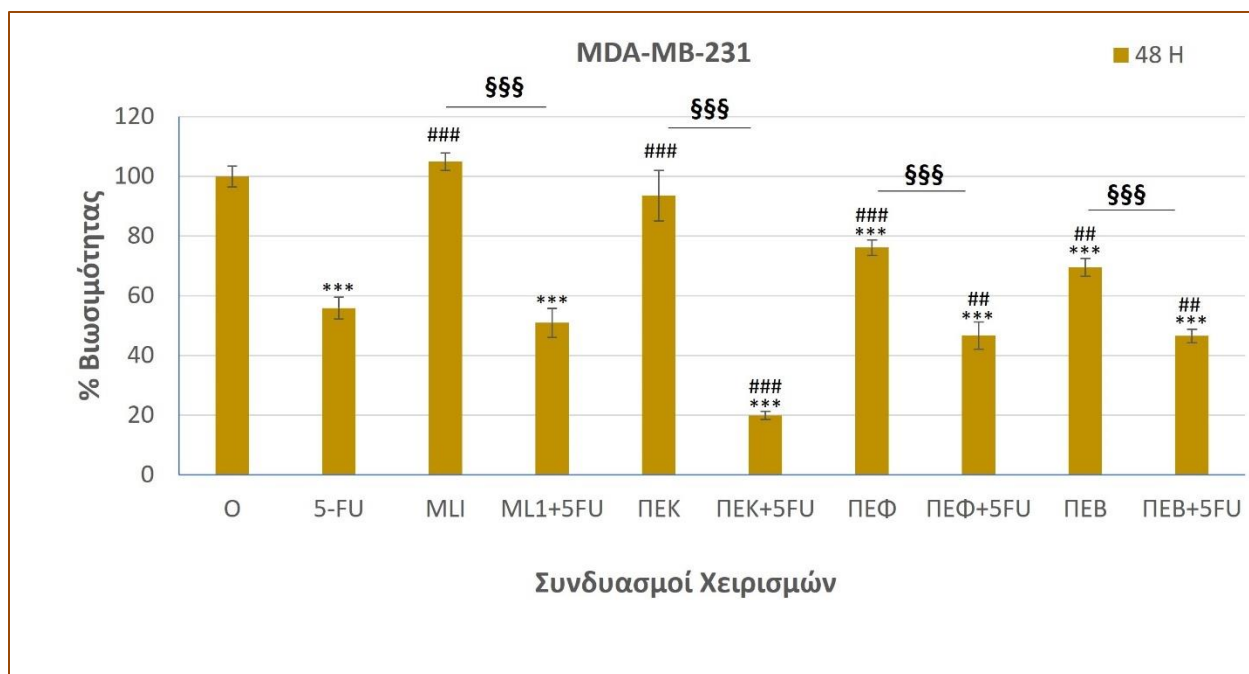
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ιξού σε συνδυασμό με τη 5-FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετά από επώαση 24 ωρών, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-10 . Παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά συγχρόνηση του φαρμάκου με τη λεκτίνη (65.26±7.85%) και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φύλλων (61,67±10,68%) δεν διαφοροποιείται σε σχέση με τη μεμονωμένη επίδραση της 5-FU. Ο συνδυασμός του εκχυλίσματος κάλων με τη 5-FU προκαλεί μείωση της επίδρασης του αντινεοπλασματικού παράγοντα στην κυτταρική βιωσιμότητα (76,49±7,15%). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα βλαστών μειώνει σημαντικά τη

κυτταρική βιωσιμότητα κατά την επώαση των 24 ωρών, και ο συνδυασμός με τη 5-FU (45,73±3,55%) δεν διαφοροποιεί την επίδραση του



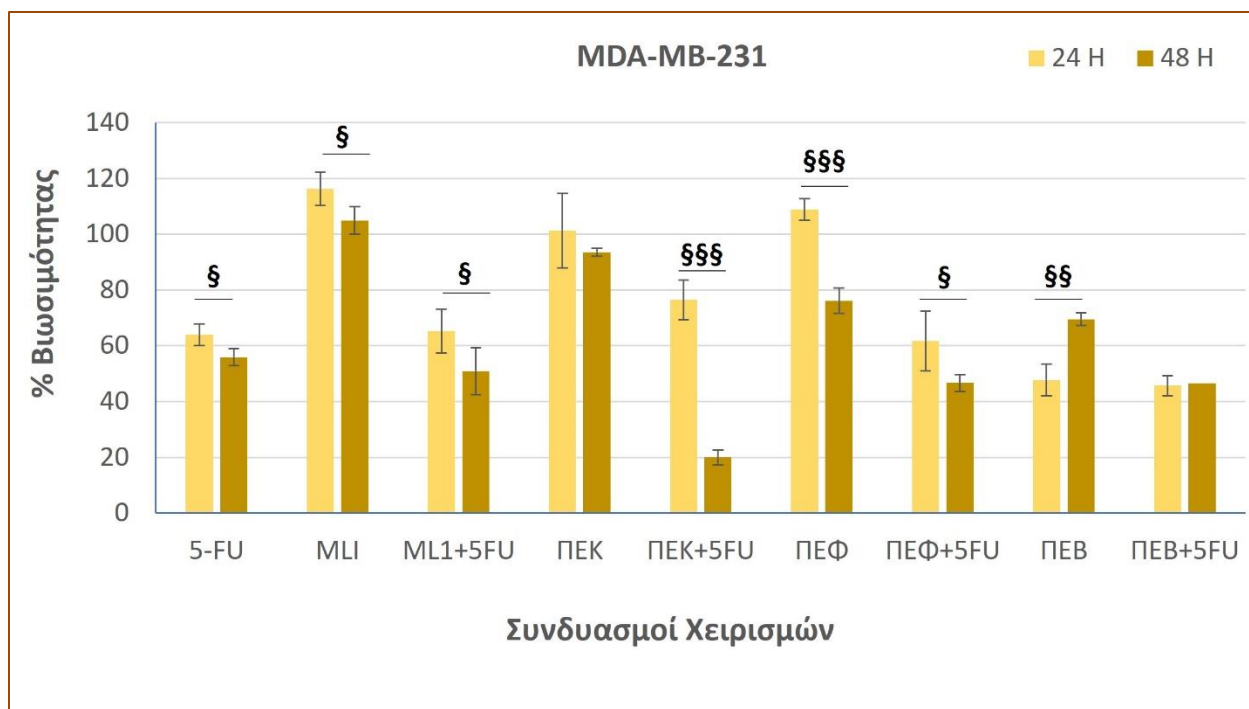
Εικόνα 5- 10: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη για 24 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με ± % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των πρωτεϊνών ξού σε συνδυασμό με τη 5-FU στη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετά από επώαση 48 ωρών, παρουσιάζονται στην εικόνα 5-11 . Παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη συγχρόνηση του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες είναι μειωμένη σε σχέση με τη μεμονωμένη χορήγηση των πρωτεϊνών. Η βιωσιμότητα μετά τη χορήγηση λεκτίνης σε συνδυασμό με τη 5-FU (50,92±4,91%) δεν διαφοροποιεί την επίδραση του φαρμάκου. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε συνδυασμό με το φάρμακο, ειδικά τα εκχυλίσματα κάλων, επιδρούν σημαντικά στο κυτταρικό πληθυσμό και τα επίπεδα βιωσιμότητας είναι κάτω από 50% (ΠΕΚ+5-FU: 19,95±1,38%. ΠΕΦ+5-FU: 46,65±4,60%, ΠΕΒ+5-FU: 46,50±2,28%).



Εικόνα 5- 11. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη για 48 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5- φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Η επίδραση του χρόνου επώασης παρουσιάζεται στην εικόνα 5-12. Η 5-FU και τα εκχυλίσματα φύλλων έχουν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα όσο αυξάνει ο χρόνος χορήγησης, ενώ η μεμονωμένη χορήγηση λεκτίνης προκαλεί μείωση του μιτοχονδρικού μεταβολισμού. Τα εκχυλίσματα βλαστών έχουν μικρότερη κυτταροτοξική δράση όσο αυξάνει το χρονικό διάστημα του χειρισμού. Η επίδραση των εκχυλισμάτων κάλων δεν διαφοροποιείται στα δύο χρονικά διαστήματα επώασης που εφαρμόστηκαν. Ο συνδυασμός του φαρμάκου με τα εκχυλίσματα βλαστών έχει αντίστοιχη δράση στις 24 (45,73 \pm 3,55%) και τις 48 ώρες(46,50 \pm 2,28%). Αντιθέτως όλοι οι άλλοι συνδυασμοί πρωτεϊνών ιξού με 5-FU προκαλούν σημαντική μείωση της βιωσιμότητας όσο αυξάνει ο χρόνος χορήγησης.



Εικόνα 5- 12. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τη βιωσιμότητα κυττάρων MDA-MB-231, μετά από επίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιστών ιξού και λεκτίνης ML-I μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με 5-φθοροουρακίλη για 24 και 48 ώρες. ML-I: λεκτίνη (0,5 μg/mL), ΠΕΚ: εκχύλισμα κάλων (0,5 μg/mL), ΠΕΦ: εκχύλισμα φύλλων (0,5 μg/mL), ΠΕΒ: εκχύλισμα βλαστών (0,25 μg/mL), 5-FU: 5-φθοροουρακίλη (150 μM). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό σε σχέση με τον μάρτυρα με \pm % τυπική απόκλιση, μετά από μέτρηση της απορρόφησης της χρωστικής MTT. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$

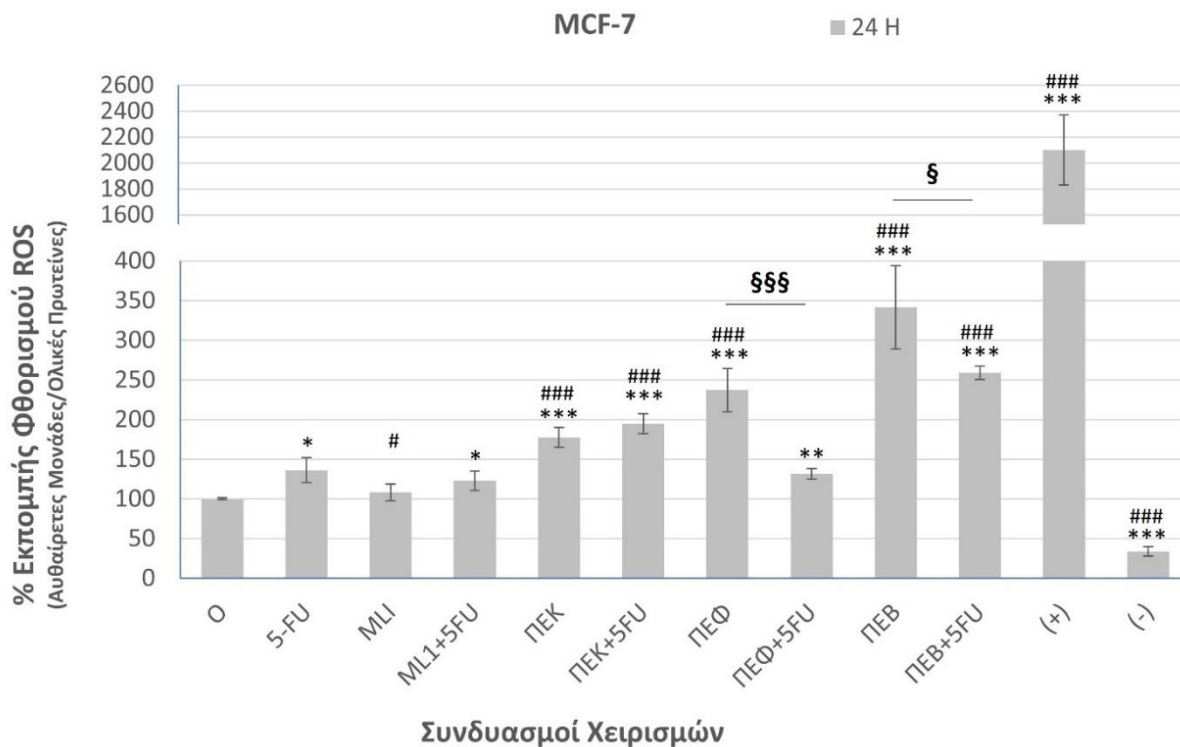
5.3. Επίδραση των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στις κυτταρικές σειρές MCF7 και MDA-MB-231.

Η χορήγηση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το φάρμακο 5FU επιδρά στη βιωσιμότητα και την μιτοχονδριακή λειτουργία των καρκινικών κυττάρων MCF7 και MDA-MB-231. Τα επίπεδα συσσώρευσης των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) σε ενδοκυτταρικό επίπεδο σχετίζονται με τη πρόκληση απόπτωσης και την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Ο προσδιορισμός τους στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη χρήση του ιχνηθέτη H2DCFDA. Οι πρωτεΐνες χορηγήθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-FU, για δύο χρονικές περιόδους επώασης για 24 και 48 ώρες, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT. Τα επίπεδα ROS εκτιμήθηκαν φθορισμομετρικά, μετρώντας την ένταση φθορισμού του ιχνηθέτη και στη συνέχεια κανονικοποιήθηκαν προς το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων και ως προς το μάρτυρα (ποσοστό %). Ο αναστολέας βιοσύνθεσης ROS, N-ακετυλο-1-κυστεΐνη, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός έλεγχος (-) των μετρήσεων μετά από επώαση των κυττάρων με το παράγοντα σε συγκέντρωση 0,5 M. Αντίστοιχα, 400 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) χρησιμοποιήθηκαν για τον θετικό έλεγχο (+) παραγωγής ROS από τα κύτταρα.

5.3.1. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά MCF7.

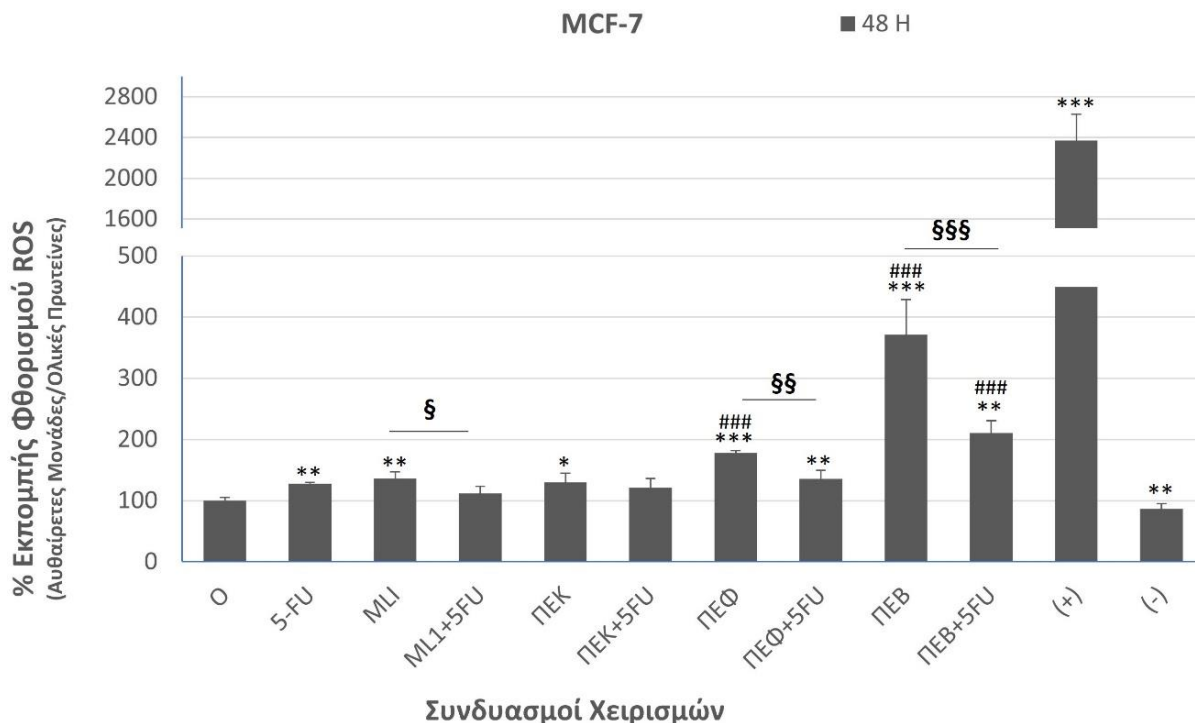
Οι πρωτεΐνες χορηγήθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-FU, για δύο χρονικές περιόδους επώασης για 24 και 48 ώρες, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT.

Στην εικόνα 5-13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των χειρισμών στα επίπεδα ROS των κυττάρων MCF-7. Η λεκτίνη ήταν ο μόνος χειρισμός που δεν διαφοροποιήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα, όλες οι άλλες εφαρμογές προκάλεσαν την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επίσης η ML-I είχε μικρότερα επίπεδα ROS σε σχέση με τη 5-FU, ενώ ο συνδυασμός τους έχει αντίστοιχη επίδραση με τη μεμονωμένη χορήγηση του αντινεοπλασματικού παράγοντα. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα καλων όταν χορηγήθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τη 5-FU παρουσίασαν ίδια επίπεδα ROS, ενώ στα εκχυλίσματα φύλλων και βλαστών η μεμονωμένη χορήγηση είχε υψηλότερο σχηματισμό ελευθέρων ριζών σε σχέση με το συνδυασμό τους με το φάρμακο.



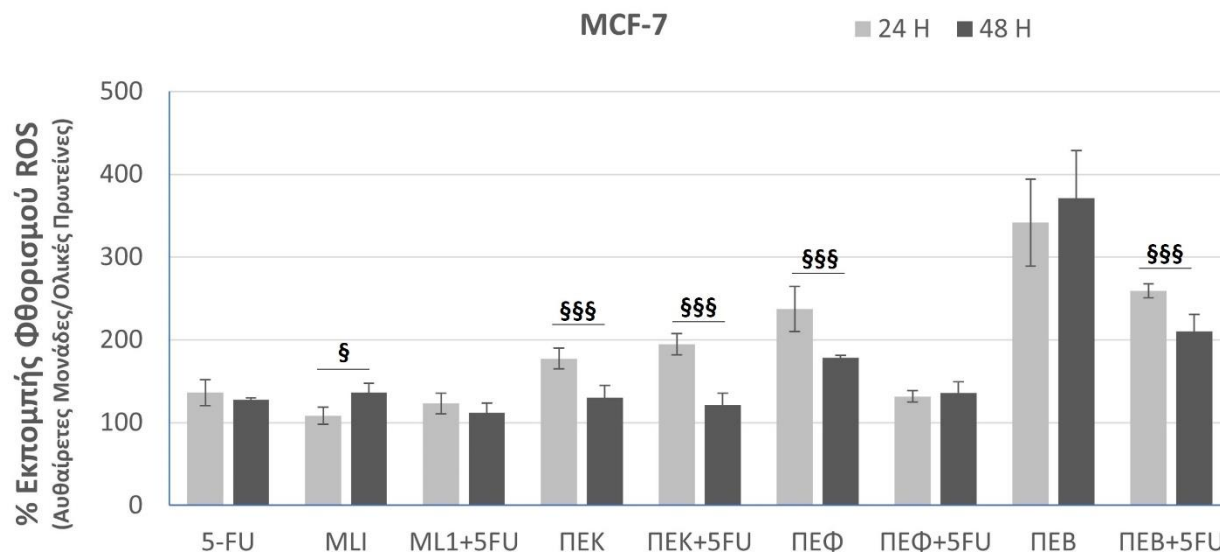
Εικόνα 5- 13: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MCF-7 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-1, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 25 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Κατά την 48ωρη επώαση παρατηρείται ότι υπάρχει αύξηση στα επίπεδα ROS σε σχέση με το μάρτυρα με εξαίρεση τους χειρισμούς συγχορήγησης 5-FU, με τη λεκτίνη και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κάλων. Η μεμονωμένη εφαρμογή του φαρμάκου αυξάνει τα επίπεδα ROS, αλλά η επίδραση των εκχυλισμάτων φύλλων, βλαστών και του συνδυασμού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος βλαστών με το φάρμακο, είναι πιο σημαντική ως προς την αύξηση των επιπέδων ελευθέρων ριζών των κυττάρων. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κάλων όταν χορηγούνται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τη 5-FU εμφανίζουν αντίστοιχα επίπεδα παραγωγής ROS ενώ η συγχορήγηση του φαρμάκου με τους υπόλοιπους πρωτεϊνικούς χειρισμούς προκαλεί μείωση των ελευθέρων ριζών σε σχέση με την επίδραση των πρωτεϊνών ιξού μεμονωμένα.



Εικόνα 5- 14: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MCF-7 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 25 μM 5-FU για διάστημα 48ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Στην εικόνα 5-15 που ακολουθεί παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου επώασης των χειρισμών στην δημιουργία ROS. Η αύξηση του χρόνου επώασης κατά τον χειρισμό με λεκτίνη ιξού, προκαλεί αύξηση της παρουσίας ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Η επίδραση των εκχυλισμάτων κάλου είναι μικρότερη στο διάστημα επώασης 48 ωρών και παρόμοια τάση παρουσιάζει και η συγχορήγηση των πρωτεϊνών κάλου με τον αντινεοπλασματικό παράγοντα. Τα εκχυλίσματα φύλλου σχηματίζουν περισσότερες ελεύθερες ρίζες κατά το μικρότερο διάστημα επώασης, όπως και τα εκχυλίσματα βλαστών σε συνδυασμό με τη 5-FU.



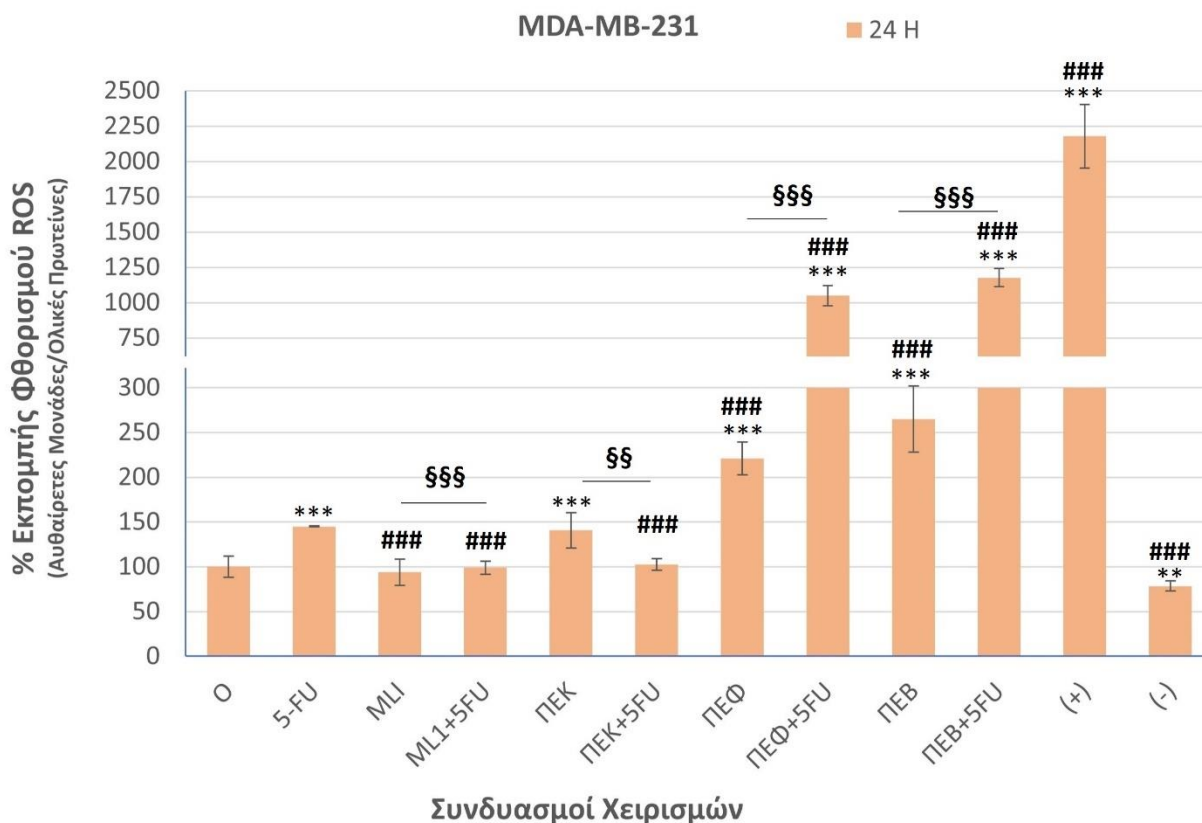
Συνδυασμοί Χειρισμών

Εικόνα 5- 15: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MCF-7 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 25 μM 5-FU για διάστημα 48ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

5.3.2. Επίδραση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ιξού και της λεκτίνης ML-1, σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-φθοροουρακίλη, στα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) στη κυτταρική σειρά MDA-MB-231.

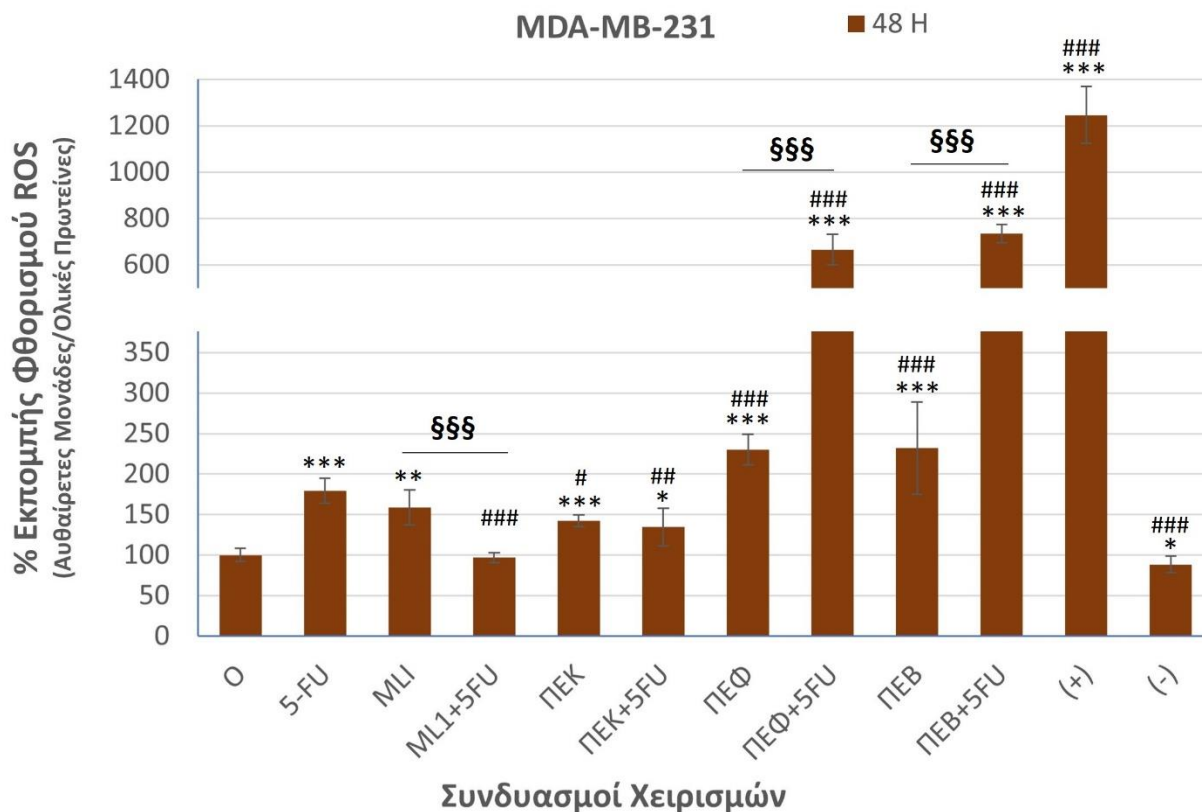
Οι πρωτεΐνες χορηγήθηκαν μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το αντικαρκινικό φάρμακο 5-FU, για δύο χρονικές περιόδους επώασης για 24 και 48 ώρες, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT. Τα αποτελέσματα της επίδρασης των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ROS κατά την επώαση των 24 ωρών παρουσιάζονται στην εικόνα 5-16. Ο χειρισμός των κυττάρων με λεκτίνη, με συνδυασμένη χορήγηση λεκτίνης και φαρμάκου καθώς και ο χειρισμός με συνδυασμένη χορήγηση 5-FU και πρωτεϊνών κάλου, δεν επέδρασαν στα επίπεδα σχηματισμού ROS σε σχέση με το μάρτυρα. Όλες οι άλλες επεμβάσεις είχαν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η λεκτίνη είχε μειωμένη επίδραση στο σχηματισμό ROS σε σχέση με τη 5-FU. Η συγχορήγηση της με το φάρμακο συνέβαλε στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά σε επίπεδα κάτω από αυτά του φαρμάκου. Η συνδυασμένη χορήγηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κάλων και 5-FU μείωσε τα επίπεδα παραγωγής ελευθέρων ριζών σε σχέση με την

μεμονωμένη εφαρμογή τους στα κύτταρα. Αντίθετα ο συνδυασμός των εκχυλισμάτων βλαστών και φύλλων με τη φθοριοουρακίλη ενίσχυσε πολύ σημαντικά την παραγωγή ROS, σε σχέση με τη μεμονωμένη εφαρμογή των παραγόντων.



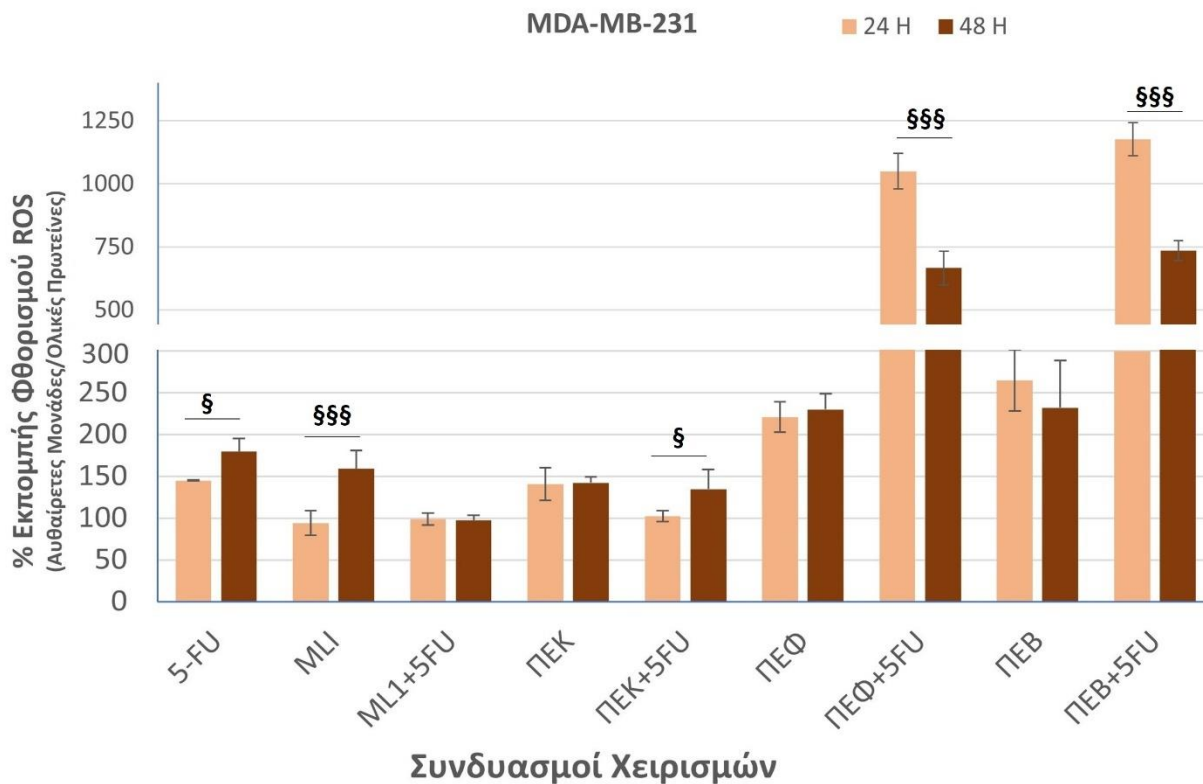
Εικόνα 5- 16: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MDA-MB-231 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των χειρισμών στα επίπεδα παραγωγής ROS κατά την επώαση των 48 ωρών στα κύτταρα MDA-MB-231 παρουσιάζονται στην εικόνα 5-17. Ο συνδυασμός της λεκτίνης με τη 5-FU δεν διαφοροποιεί τα επίπεδα παραγωγής ROS σε σχέση με το μάρτυρα, σε αντίθεση με όλες τις άλλες επεμβάσεις που δρουν αυξητικά. Το φάρμακο και η λεκτίνη έχουν αντίστοιχη επίδραση αλλά ο συνδυασμός τους και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάλων, είτε μεμονωμένο ή σε συνδυασμό με τη 5-FU, σχηματίζουν μικρότερο ποσοστό ROS σε σχέση με τη 5-FU. Ο συνδυασμός των εκχυλισμάτων βλαστών και φύλλων με τη φθοριοουρακίλη ενίσχυσε πολύ σημαντικά την παραγωγή ROS, σε σχέση με τη μεμονωμένη εφαρμογή των παραγόντων.



Εικόνα 5- 17: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MDA-MB-231 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Στην εικόνα 5-18 που ακολουθεί παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου επώασης των χειρισμών στην δημιουργία ελευθέρων ριζών. Η αύξηση του χρόνου επώασης αυξάνει τα επίπεδα σχηματισμού ελευθέρων ριζών στα κύτταρα, κατά τη χορήγηση του φαρμάκου, της λεκτίνης και του συνδυασμού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος φύλλων με το φάρμακο. Η μεταχείριση με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έχει αντίστοιχη επίδραση στα επίπεδα ελευθέρων ριζών και στις δύο περιόδους επώασης. Ο συνδυασμός της 5-FU με τις πρωτεΐνες των φύλλων και των βλαστών, συντελεί στη μεγάλη παραγωγή ROS κατά την επώαση για 24 ώρες, ενώ σε μεγαλύτερο χρόνο εφαρμογής μειώνονται τα επίπεδα ελευθέρων ριζών.

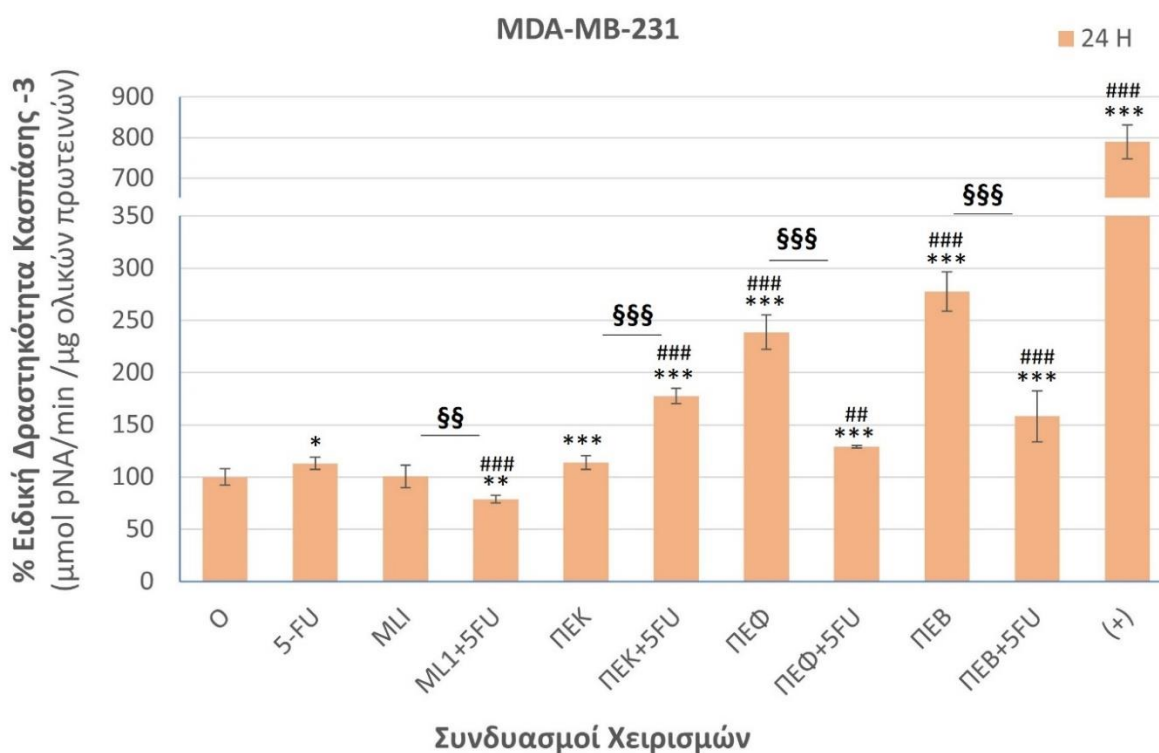


Εικόνα 5- 18: Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τα επίπεδα παραγωγής ROS σε κύτταρα MDA-MB-231 μετά την επώαση με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 24 και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αυθαίρετες μονάδες μετά την κανονικοποίηση της έντασης φθορισμού του ιχνηθέτη DCFH-DA προς τις ολικές πρωτεΐνες. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

5.4. Επίδραση των χειρισμών στην ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3 της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231.

Για να μελετηθεί αν η μείωση της βιωσιμότητας που προκαλείται από τη δράση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, των αντικαρκινικών φαρμάκων και των συνδυασμών τους οφείλεται στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού, πραγματοποιούνται φασματομετρικός προσδιορισμός της ειδικής δραστικότητας της κασπάσης-3 και μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών κάθε δείγματος. Τα ακόλουθα γραφήματα παρουσιάζουν την ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3 κανονικοποιημένη ως προς τις ολικές πρωτεΐνες του κάθε δείγματος με το πέρας των δύο επώασεων.

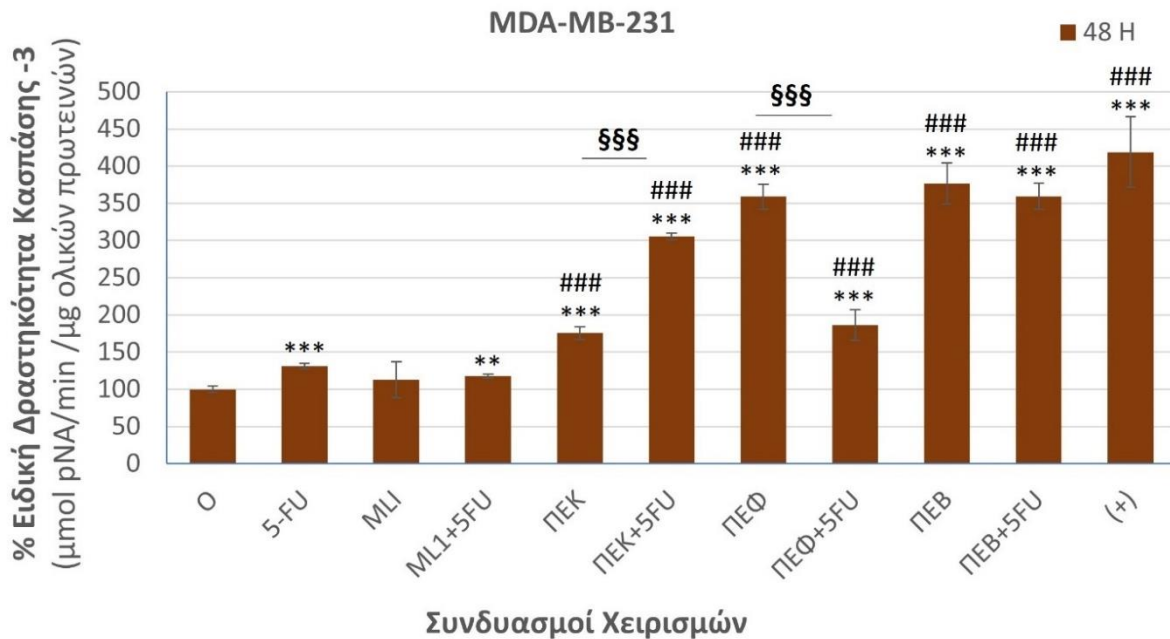
Η εκτίμηση της επίδρασης της επώασης των κυττάρων για 24 ώρες με τις πρωτεΐνες ιξού, τη φθοριουρακίλη και τους συνδυασμούς τους, στα επίπεδα ειδικής δραστικότητας του ενζύμου κασπάση-3 παρουσιάζεται στην εικόνα 5-19. Η εφαρμογή της ML1, κατά την 24ωρη επώαση, οδηγεί σε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας όταν συνδυάζεται με το αντικαρκινικό φάρμακο. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιδρούν θετικά στην ενεργοποίηση του ενζύμου αλλά ο συνδυασμός τους με τη φθοριουρακίλη προκαλεί αύξηση της επίδρασης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κάλου και μείωση της επίπτωσης των εκχυλισμάτων φύλλων και βλαστών.



Εικόνα 5- 19. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστικότητα της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων MDA-MB-231 με 0.5 μg/mL ML-1, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μΜ

5-FU για διάστημα 24 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μολι p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

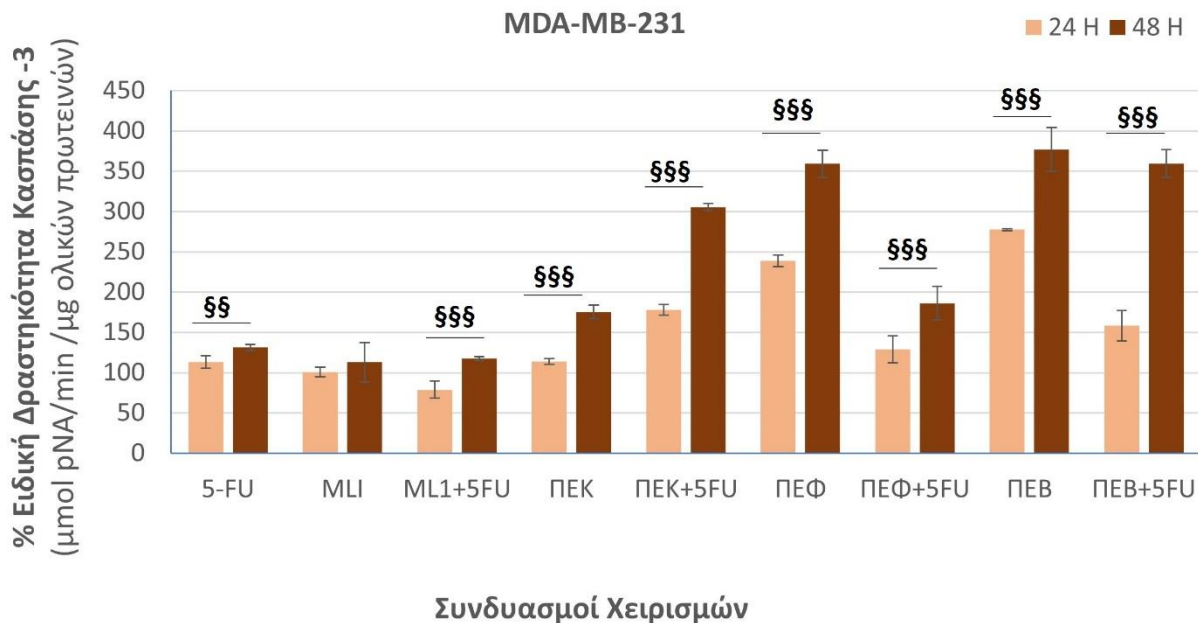
Η εκτίμηση της επίδρασης της επώασης των κυττάρων για 48 ώρες παρουσιάζεται στην εικόνα 5-20. Η ML-I δεν επιδρά στην ενεργοποίηση του ενζύμου, και ο συνδυασμός με τη 5-FU έχει αντίστοιχη επίδραση με τη χορήγηση του φαρμάκου μεμονωμένα. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιδρούν θετικά στα επίπεδα ενεργότητας της κασπάσης-3 αλλά η δράση τους σε συγχορήγηση με τη 5-FU ποικίλει, καθώς η προσθήκη του αντινεοπλασματικού στα εκχυλίσματα κάλων ενεργοποιούν περαιτέρω ενεργοποίηση του ενζύμου, στα εκχυλίσματα φύλλων μείωση και στα εκχυλίσματα βλαστών δεν διαφοροποιούν το τελικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 5- 20. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων MDA-MB-231 με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μολι p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Οι μέσες τιμές: α) διαφέρουν από το μάρτυρα (0) σε επίπεδο σημαντικότητας * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, β) διαφέρουν από τη 5-FU σε επίπεδο σημαντικότητας # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, γ) κάθε χειρισμού διαφέρουν από τον αντίστοιχο χειρισμό σε συνδυασμό με 5-FU, σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

Η επίδραση του χρόνου επώασης των χειρισμών στα επίπεδα ενεργότητας της κασπάσης-3 παρουσιάζεται αναλυτικότερα στην εικόνα 5-21. Παρατηρείται ότι η λεκτίνη δεν επηρεάζει τα επίπεδα του ενζύμου στη κυτταρική σειρά και δεν επηρεάζεται από το χρόνο επώασης. Ο χρόνος επώασης είναι πολύ σημαντικός για τους υπόλοιπους χειρισμούς καθώς

όσο αυξάνει η διάρκεια δράσης των επεμβάσεων στα κύτταρα, αυξάνουν και τα επίπεδα ειδικής δραστηριότητας της κασπάσης-3.



Εικόνα 5- 21. Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα της κασπάσης-3 μετά την επώαση κυττάρων MDA-MB-231 με 0.5 μg/mL ML-I, 0.5 μg/mL ΠΕΚ, 0.5 μg/mL ΠΕΦ, 0.25 μg/mL ΠΕΒ και συνδυασμών τους με 150 μM 5-FU για διάστημα 48 ωρών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μολ p-νιτροανιλίνης που ελευθερώνονται ανά λεπτό, ανά μg ολικών πρωτεϊνών. Οι μέσες τιμές κάθε χειρισμού κατά την επώαση 24 ωρών διαφέρει από τον αντίστοιχο χειρισμό της επώασης 48 ωρών σε επίπεδο σημαντικότητας § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$.

5.5. Συμπεράσματα και συζήτηση επίδρασης των χειρισμών στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231.

Ο καρκίνος παραμένει στις μέρες μια ιδιαίτερα σημαντική ασθένεια και υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την ανακάλυψη νέων επιλεκτικών αντικαρκινικών φαρμάκων. Η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται στη μελέτη φυσικών πόρων για την εξεύρεση βιομορίων με δυνητικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αλλοιωμένα πρότυπα γλυκοζυλίωσης επηρεάζοντας πολλές ενδοκυτταρικές οδούς και τροποποιώντας μια σειρά βιολογικών ιδιοτήτων. Αυτές οι παρεκκλίνουσες αλλαγές παρέχουν μια πιθανή βάση για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων με ιδιότητες επιλεκτικής στόχευσης, έναντι συγκεκριμένων προτύπων γλυκοζυλίωσης (Ghorbani and Karimi 2015) . Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες ιδιαίτερα εξειδικευμένες ως προς τη σύνδεση τους με γλυκάνες. Τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια είναι ευρέως διαδεδομένα στους ζώντες οργανισμούς και εμπλέκονται σε αρκετές κυτταρικές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, εκδηλώνοντας ανοσοδιεγερτικές και αντικαρκινικές λειτουργίες (Gondim κ.ά., 2017).

Η εξειδικευμένη δέσμευση των λεκτινών με τα καρκινικά κύτταρα διεγείρει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες που κυμαίνονται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έως τον θάνατο του καρκινικού κυττάρου. Η εφαρμογή των λεκτινών στη χημειοθεραπεία παρουσιάζει κυτταροτοξικές, αποπτωτικές, αυτοφαγικές και αντικαρκινικές επιδράσεις, καθώς και σημαντικές ανοσοδυναμικές και μιτογονικές ιδιότητες . Ο Ευρωπαϊκός ιξός είναι ένα από τα πιο σημαντικά είδη φυτών με αντικαρκινικές ιδιότητες, που παράγει τρεις πολύ σημαντικές αντικαρκινικές λεκτίνες. Σήμερα, πρωτεϊνικά παρασκευάσματα ιξού βρίσκονται στη κορυφή της συμπληρωματικής θεραπείας και της ανθρωποσοφικής θεραπείας του καρκίνου. Οι λεκτίνες είναι ελπιδοφόρα εργαλεία για τη θεραπεία του καρκίνου, ωστόσο απαιτείται εκτενής έρευνα προκειμένου να καθοριστεί ο τύπος του καρκίνου που στοχεύουν, ο τρόπος δράσης και η δοσολογία (Tsekouras 2019).

Η πρωτεΐνη ML-I χορηγήθηκε στα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε βιοδραστικότητα και αύξηση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού, καθώς και κυτταροτοξικές επιδράσεις στα MCF-7, στη μέγιστη δόση που χρησιμοποιήθηκε και στη μέγιστη χρονική διάρκεια επώασης. Η επώαση των κυττάρων με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επάγει διαφορετικές αντιδράσεις ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προήλθαν τα εκχυλίσματα. Πρωτεΐνες από τους βιοτεχνολογικά παραγόμενους κάλους προάγουν την κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αύξησης της μιτοχονδριακής δραστηριότητας, σε αντίθεση με εκείνα που προέρχονται από φύλλα και βλαστούς του ιξού, που εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα, κυρίως με το πέρας των 48 ωρών. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική πρωτεϊνική σύσταση των εκχυλισμάτων, καθώς και στη διαφορετική αναλογία λεκτινών που ενδέχεται να έχουν. Σε προηγούμενες μελέτες έχει

αναφερθεί ότι οι βιοδραστικές ενώσεις του γκι εξαρτώνται από διάφορες παραμέτρους όπως τα οικολογικά χαρακτηριστικά των ξενιστών, το κύκλος ζωής του φυτού καθώς επίσης και τον τύπο του οργάνου, και κατά συνέπεια διαφοροποιούνται και οι θεραπευτικές ιδιότητες εκχυλισμάτων (Yousefvand et al. 2022). Σε πρόσφατη μελέτη, η χορήγηση διαφορετικών εκχυλισμάτων ιξού, του Iscadog Qu και του Iscadog M στις κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231, έδειξε ότι τα παρασκευάσματα Iscadog παρουσιάζουν επιλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών. Οι παρατηρούμενες διαφορές στη δράση των δύο φυτικών εκχυλισμάτων αποδόθηκαν στις διαφορές στις αναλογίες μεταξύ των δραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων (Robev et al. 2023)

Η 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η επίδραση της παρουσίας του αντινεοπλασματικού στο περιβάλλον ανάπτυξης των δύο καρκινικών σειρών. Η έκθεση των κυττάρων MCF7 και MDA-MB-231 σε αυξημένη συγκέντρωση 5-FU οδηγεί σε μείωση της βιωσιμότητας τους με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, και η κυτταρική σειρά MCF-7 είναι πιο ευαίσθητη σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Η συνδυασμένη εφαρμογή της λεκτίνης και των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του *Viscum album L.* με τη 5-FU μελετήθηκε με στόχο την πιθανή εύρεση συνεργιστικής δράσης μεταξύ τους. Είναι γνωστό ότι η 5-FU σε συνδυασμό με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες αυξάνει τα ποσοστά απόκρισης στο φάρμακο και διάφορα φυτικά παρασκευάσματα έχουν δοκιμαστεί για να ξεπεράσουν την ανθεκτικότητα που εμφανίζουν διάφοροι τύποι καρκίνων έναντι του αντινεοπλασματικού παράγοντα (Bar-Sela and Haim 2004, González-Vallinas et al. 2013, Dai et al. 2011). Τα αποτελέσματα από τον συνδυασμό της 5-FU με τις πρωτεΐνες ιξού παρουσιάζουν συνεργιστική δράση ανάλογα με το τύπο του κυττάρων, τη προέλευση των εκχυλισμάτων και το χρόνο επώασης. Η επώαση για 24 ώρες των κυττάρων MCF-7 με τη λεκτίνη σε συνδυασμό με το φάρμακο, δεν επέδρασε στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα, η συγχορήγηση της 5-FU με εκχυλίσματα κάλων και φύλλων προκαλούν σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ενώ δεν ενισχύει τη δράση των μεμονωμένων εκχυλισμάτων από βλαστούς. Στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επώασης (48 ώρες) παρατηρήθηκε ότι οι συνδυασμοί του φαρμάκου με τα εκχυλίσματα είχαν σημαντική επίδραση στη μείωση του κυτταρικού πληθυσμού, ενώ η συγχορήγηση λεκτίνης δεν διαφοροποίησε την επίδραση του φαρμάκου. Η επώαση για 24 ώρες των κυττάρων MDA-MB-231 με συνδυασμό φαρμάκου και πρωτεΐνες ιξού εμφάνισε ενισχυμένη κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με τη μεμονωμένη χορήγηση της λεκτίνης ή των εκχυλισμάτων. Εξάιρεση αποτελούν τα εκχυλίσματα βλαστού που δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση από τη συγχορήγηση με τη 5-FU. Κατά την επώαση για 48 ώρες τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα σε συνδυασμό με το φάρμακο, ειδικά τα εκχυλίσματα κάλων, επιδρούν σημαντικά στο κυτταρικό πληθυσμό και τα επίπεδα βιωσιμότητας είναι κάτω από 50%. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν σημαντική συνεργιστική δράση των εκχυλισμάτων με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ενώ η καθαρή λεκτίνη δεν ενισχύει την επίδραση της 5-FU.

Στα κύτταρα τα επίπεδα παραγωγής ROS μπορούν να καθορίσουν εάν το κύτταρο θα επιβιώσει ή θα πεθάνει και τον τύπο του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου που εμπλέκεται. Ο κυτταρικός θάνατος επάγεται από διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (Villalprando-Rodriguez and Gibson 2021). Εκτός από την δημιουργία ROS και την μείωση των αντιοξειδωτικών, η κυτταρική απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κασπασών. Η κασπάση-3 είναι ένα ένζυμο με σημαντικές πρωτεολυτικές λειτουργίες που επηρεάζουν τη μοίρα του κυττάρου και οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο (Musaogullari et al. 2020). Ο χρόνος επώασης, η προέλευση των εκχυλισμάτων και η συγχορήγηση της 5-FU επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα ROS και ενεργότητας της κασπάσης-3 στις κυτταρικές σειρές, υποδεικνύοντας διαφοροποιήσεις στο μηχανισμό επαγωγής της απόπτωσης, ανάλογα με το χειρισμό. Στα MCF-7, τα εκχυλίσματα έχουν κυτταροτοξική επίδραση, και τα επίπεδα ROS είναι υψηλά, αλλά κατά τη συγχορήγηση των εκχυλισμάτων με τη 5-FU παρατηρείται μείωση των ROS που υποδηλώνει διαφορετικό δρόμο ενεργοποίησης αποπτωτικών μηχανισμών. Στη κυτταρική σειρά MDA-MB-231 παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο κατά τη συγχορήγηση εκχυλισμάτων κάλων με το φάρμακο, δηλαδή μείωση των ROS, αλλά παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Η συγχορήγηση του φαρμάκου με τις πρωτείνες των φύλλων και των βλαστών είχαν αντίθετο αποτέλεσμα καθώς συνέβαλαν στην αύξηση των ROS και μείωση της δραστηριότητας της κασπάσης-3.

Η κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται στα κύτταρα MCF-7 και MDA-MB-231 μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση των επιπέδων ελευθέρων ριζών και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού των κασπασών

6. Γενικά Συμπεράσματα και Συζήτηση.

Ο ευρωπαϊκός ιξός είναι ένα φαρμακευτικό φυτό που περιέχει πρωτεϊνικές ομάδες με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Το αντικείμενο αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη ισχυρού πρωτοκόλλου κυτταροκαλλιιεργειών για τη βιοσύνθεση αντικαρκινικών πρωτεϊνών. Η παραγωγή κάλων από τον ιξό υπόκειται σε περιορισμούς καθώς μόνο οι νεαροί βλαστοί είναι επιδεκτικοί στην ιστοκαλλιέργεια για περιορισμένο χρονικό διάστημα, κατά τους μήνες Δεκέμβριο έως και Μάρτιο. Το ποσοστό καλογένεσης βλαστών του *Viscum album subsp abietis* καλογένεσης των βλαστών είναι ιδιαίτερα χαμηλό και περιορίζεται στο 6%, καθώς ο ιξός είναι δύστροπο είδος κατά την ιστοκαλλιέργεια και περιέχει ενδοφυτικούς οργανισμούς που προκαλούν δευτερογενείς μολύνσεις. Ωστόσο, η ιστοκαλλιέργεια φαίνεται να είναι μια ισχυρή εναλλακτική για τη παραγωγή και διατήρησης φυτικής βιομάζας *in vitro* με στόχο την απομόνωση βιοδραστικών μορίων. Το επόμενο βήμα για τη μαζική και ελεγχόμενη παραγωγή βιομάζας ιξού, χωρίς τους περιορισμούς που συναντώνται στη φύση, είναι η διερεύνηση της καλλιέργειας κυττάρων ιξού σε βιοαντιδραστήρα.

Οι πρωτεΐνες του ιξού γκι, έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και δυνατότητες. Η παρούσα μελέτη προσδιορίζει και συγκρίνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη διαφόρων ιστών του *Viscum album subsp. abietis* που λαμβάνονται από κάλους, φύλλα και μίσχους. Σύμφωνα με τα ευρήματά μετά από επεξεργασία δεδομένων MS με τη βάση δεδομένων Uniprot *Viscum album*, προσδιορίστηκαν πρωτεΐνες με αντικακοήθεις και ανοσοδιεγερτικές δραστηριότητες. Η καλογένεση εμφάνισε μεταβολές στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών καθώς μια μοναδική ισομορφή λεκτίνης (ML-IV) ανιχνεύθηκε μόνο στους κάλους, ενώ η παραγωγή βισκοτοξινών A3 και C1 εξαλείφθηκε. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες των Kintzios (2002) και Barberaki (2015), που προσδιόρισαν *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών σε κάλους του φυτού, και μάλιστα με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων από κάλους του φυτού ορισμένοι κάλοι είχαν διαφορετικές πρωτεϊνικές μπάντες φαινόμενο που μπορεί να αποδοθεί σε σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Πρέπει να επισημανθεί ότι η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη πρωτεομική διερεύνηση του καλού του ιξού, και θέτει τη βάση για τον μελλοντικό χαρακτηρισμό νέων πρωτεϊνών με αντικαρκινικές ιδιότητες, που πιθανώς προκύπτουν από σωματοκλωνική παραλλακτικότητα.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους κάλους που παρουσίασαν διαφορετικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο δοκιμάστηκαν σε κυτταρικές σειρές καρκίνων του στήθους και του τραχήλου της μήτρας. Ο σκοπός αυτής της δοκιμασίας ήταν να εντοπιστούν πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες των πρωτεϊνών γκι, που προέρχονται από φυσικούς πόρους και βιοτεχνολογικές τεχνικές, καθώς και τις πιθανές συνεργιστικές επιδράσεις με ένα τυπικό χημειοθεραπευτικό παράγοντα, τη 5-φθοροουρακίλη. Μελετήθηκαν οι επιδράσεις στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το οξειδωτικό

στρες και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, ευρήματα χρήσιμα για την κατανόηση των βιοχημικών οδών των πρωτεϊνών ιξού στη θεραπεία του καρκίνου.

Η εφαρμογή σε καρκινική σειρά τραχήλου της μήτρας HeLa, ανέδειξε ότι τα εκχυλίσματα πρωτεϊνών από φύλλα και βλαστούς των μητρικών φυτών είχαν ισχυρό αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των κυττάρων HeLa προάγοντας οξειδωτική βλάβη και προκαλώντας απόπτωση είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα 5-Fluorouracil. Η επίδραση των εκχυλισμάτων από κάλους ήταν αντίστοιχες με την επίδραση της καθαρής λεκτίνης ML-I στα κύτταρα, αλλά πρέπει να επισημανθεί ότι η συγχορήγηση τους με τη 5-FU εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξικότητα, αναλογικά με τη αύξηση του χρόνου επώασης. Η επίδραση των πρωτεϊνών ιξού και συνδυασμών τους με τη 5-FU σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος μαστού MCF7 και MDA-MB-231 υποδεικνύει σημαντική συνεργιστική δράση των εκχυλισμάτων με το χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ενώ η καθαρή λεκτίνη δεν ενισχύει την επίδραση της 5-FU. Με βάση το γεγονός ότι η 5-FU έχει μικρή βιοδιαθεσιμότητα, αποτελεί σημαντική ένδειξη η ενίσχυση των επιπτώσεων του σε βάθος χρόνου κατά τη συγχορήγηση με εκχυλίσματα κάλων και ιστών ιξού.

Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με τον χημειοθεραπευτικό παράγοντα κατά των καρκινικών κυττάρων που μελετήθηκαν. Παρά τη χαμηλή κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται για τα εκχυλίσματα κάλων, η ικανότητα βιοτεχνολογικής παραγωγής πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων γκι είναι σημαντική επειδή επιτρέπει την τυποποίηση της παραγωγής που δεν είναι δυνατή με την τρέχουσα συμβατική μέθοδο λήψης εκχυλισμάτων ιξού. Οι θετικές αλλαγές στο γενετικό προφίλ των φυτών μέσω της σωμακλωνικής παραλλαγής μπορούν να παρέχουν μια ταχεία πηγή μεταβλητότητας για την ανάπτυξη νέων ενώσεων με πιθανές φαρμακευτικές

Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση φυσιολογικών και παθολογικών εφαρμογών καθώς είναι μη επεμβατικές μέθοδοι για την ανίχνευση κρίσιμων βιοδεικτών της κυτταροτοξικότητας των καρκινικών κυττάρων χωρίς την ανάγκη εκτεταμένης προμεταχείρισης του δείγματος. Σε αυτή τη μελέτη, παρουσιάζουμε ένα εργαλείο βιοαισθητήρα βασισμένο σε κύτταρα κατάλληλο για παρακολούθηση σουπεροξειδίου, στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιεργειών μετά από θεραπεία. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα ευρήματα των βιοχημικών αναλύσεων για την αξιολόγηση των δράσεων του μιτοχονδριακού σουπεροξειδίου και της κασπάσης-3 σε κύτταρα HeLa. Απαιτείται περαιτέρω επικύρωση της σκοπιμότητας της προσέγγισής μας και η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου, υψηλής απόδοσης και γρήγορου συστήματος για τον προσδιορισμό του σουπεροξειδίου στα καρκινικά κύτταρα. Ένα τέτοιο εργαλείο θα επιτρέψει την ακριβή αξιολόγηση της χημειοαντοχής των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με την ισορροπία οξειδοαναγωγής

Βιβλιογραφία

- Anand, Uttpal, Abhijit Dey, Arvind K. Singh Chandel, Rupa Sanyal, Amarnath Mishra, Devendra Kumar Pandey, Valentina De Falco, Arun Upadhyay, Ramesh Kandimalla, Anupama Chaudhary, Jaspreet Kaur Dhanjal, Saikat Dewanjee, Jayalakshmi Vallamkondu, and José M. Pérez de la Lastra. 2023. "Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics." *Genes & Diseases* 10 (4):1367-1401. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>.
- Andrés-Colás, Nuria, and Dominique Van Der Straeten. 2017. "Optimization of non-denaturing protein extraction conditions for plant PPR proteins." *PLOS ONE* 12 (11):e0187753. doi: 10.1371/journal.pone.0187753.
- Andrew, S. M., J. A. Titus, and L. Zumstein. 2002. "Dialysis and concentration of protein solutions." *Curr Protoc Toxicol* Appendix 3:A.3h.1-5. doi: 10.1002/0471140856.txa03hs10.
- Anonymous. 2019. "PDQ Mistletoe Extracts." National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/mistletoe-pdq>.
- Anson, F., S. Thayumanavan, and J. A. Hardy. 2021. "Exogenous Introduction of Initiator and Executioner Caspases Results in Different Apoptotic Outcomes." *JACS Au* 1 (8):1240-1256. doi: 10.1021/jacsau.1c00261.
- Apostolou, Theofylaktos, Sophia Mavrikou, Nikoleta-Kleio Denaxa, Georgia Paivana, Peter A. Roussos, and Spyridon Kintzios. 2019. Assessment of Cypermethrin Residues in Tobacco by a Bioelectric Recognition Assay (BERA) Neuroblastoma Cell-Based Biosensor. *Chemosensors* 7 (4). doi:10.3390/chemosensors7040058.
- Aslam, Bilal, Madiha Basit, Muhammad Atif Nisar, Mohsin Khurshid, and Muhammad Hidayat Rasool. 2017. "Proteomics: Technologies and Their Applications." *Journal of Chromatographic Science* 55 (2):182-196. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
- Baek, Jeong-Heum, Youngbae Jeon, Kyoung-Won Han, Dong Hae Jung, and Kyung-Ok Kim. 2021. "Effect of mistletoe extract on tumor response in neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: a cohort study." *World Journal of Surgical Oncology* 19 (1):178. doi: 10.1186/s12957-021-02293-4.
- Baillon, F. . 1988. "Seasonal variation of respiration, phloem-transport and carbohydrate content in European mistletoe. ." *Plant Physiol Biochem* 26:85–91.
- Balakrishnan, S., S. Atal, A. Ray, C. A. Pravin, and M. Nanda. 2020. "Organoids: An invaluable tool in pharmacology." *Indian J Pharmacol* 52 (5):422-429. doi: 10.4103/ijp.IJP_137_19.
- Bantel, H., I.H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg. 1999. "Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis." *Cancer Res* 59 (9):2083-2090.
- Bakhtiari, Shide, Mohammad K. D. Manshadi, Mehmet Candas, and Ali Beskok. 2023. Changes in Electrical Capacitance of Cell Membrane Reflect Drug Partitioning-Induced Alterations in Lipid Bilayer. *Micromachines* 14 (2). doi:10.3390/mi14020316.
- Bar-Sela, G., and N. Haim. 2004. "Abnoba-viscum (mistletoe extract) in metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil and leucovorin-based chemotherapy." *Med Oncol* 21 (3):251-4. doi: 10.1385/mo:21:3:251.
- Barberaki, Maria, E. Dermizaki, Andrew Margioris, Maria Theodosaki, Stylianos Grafakos, and Spiridon Kintzios. 2015. "Protein Extracts from Somaclonal Mistletoe (*Viscum Album* L.) Callus with Increased Tumor Cytotoxic Activity in Vitro." *Current Bioactive Compounds* 11:1-1. doi: 10.2174/1573407211666150602215615.

- Barberaki M, Kintzios, S. 2002. "Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: Effect of medium composition and explant source". *Scientia Horticulturae* Vol. 95 Pages 133-150. DOI: 10.1016/S0304-4238(02)00017-1
- Barney, C. W., F. G. Hawksworth, and B. W. Geils. 1998. "Hosts of *Viscum album*." *European Journal of Forest Pathology* 28 (3):187-208. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1998.tb01249.x>.
- Baust, John G., Dayong Gao, and John M. Baust. 2009. "Cryopreservation: An emerging paradigm change." *Organogenesis* 5 (3):90-96. doi: 10.4161/org.5.3.10021.
- Ben-Arye, E., E. Schiff, M. Steiner, Y. Keshet, and O. Lavie. 2012. "Attitudes of patients with gynecological and breast cancer toward integration of complementary medicine in cancer care." *Int J Gynecol Cancer* 22 (1):146-53. doi: 10.1097/IGC.0b013e318226c614.
- Beuth, J., B. Stoffel, R. Samtleben, O. Staak, H. L. Ko, G. Pulverer, and H. Wagner. 1996. "Modulating activity of mistletoe lectins 1 and 2 on the lymphatic system in BALB/c-mice." *Phytomedicine* 2 (3):269-273. doi: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(96\)80054-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(96)80054-7).
- Bhalla, N., P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela. 2016. "Introduction to biosensors." *Essays Biochem* 60 (1):1-8. doi: 10.1042/ebc20150001.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brahmkshatriya, Priyanka P., and Pathik S. Brahmkshatriya. 2013. "Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications." In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, edited by Kishan Gopal Ramawat and Jean-Michel Mérillon, 2665-2691. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Branham, Susheela, V. Krishna, S. Gopal, and Jacob Solomon Raju Aluri. 2012. "Evaluation of Caspase-3 as a Possible Indicator of Apoptotic Activity to Assess the Chemoresistance / Sensitivity." *Journal of Pharmacy Research* 5:229-231.
- Brentnall, M., L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero, and L. H. Boise. 2013. "Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis." *BMC Cell Biol* 14:32. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.
- Brogdon, W. G., and C. M. Dickinson. 1983. "A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions." *Anal Biochem* 131 (2):499-503. doi: 10.1016/0003-2697(83)90204-x.
- Brunelle, Julie L., and Rachel Green. 2014. "Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)." In *Methods in Enzymology*, edited by Jon Lorsch, 151-159. Academic Press.
- Bueter, Chelsea L., Charles A. Specht, and Stuart M. Levitz. 2013. "Innate Sensing of Chitin and Chitosan." *PLOS Pathogens* 9 (1):e1003080. doi: 10.1371/journal.ppat.1003080.
- Bussing, A., K. Suzart, and K. Schweizer. 1997. "Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts." *Anti-Cancer Drugs* 8 (Supplement 1):S9-S14. doi: 10.1097/00001813-199704001-00003.
- Buyel, J. F., Richard Twyman, and Rainer Fischer. 2015. "Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins." *Biotechnology advances* 33. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.010.
- Casale, J., and P. Patel. 2023. "Fluorouracil." In *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Preeti Patel declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing

- Chang, J. Y. 1997. "A two-stage mechanism for the reductive unfolding of disulfide-containing proteins." *J Biol Chem* 272 (1):69-75.
- Chen, Q., F. Wright, L. J. Duncan, and A. L. Huntley. 2022. "Profiling mistletoe therapy research and identifying evidence gaps: A systematic review of conditions treated, mode of application and outcomes." *European Journal of Integrative Medicine* 49:101392. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.101392>.
- Cheng, H., M. Byrska-Bishop, C. T. Zhang, C. J. Kastrup, N. S. Hwang, A. K. Tai, W. W. Lee, X. Xu, M. Nahrendorf, R. Langer, and D. G. Anderson. 2012. "Stem cell membrane engineering for cell rolling using peptide conjugation and tuning of cell-selectin interaction kinetics." *Biomaterials* 33 (20):5004-12. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.065.
- Chevallet, Mireille, Sylvie Luche, and Thierry Rabilloud. 2006. "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Nature protocols* 1 (4):1852-1858. doi: 10.1038/nprot.2006.288.
- Coulon, Alexandre, Amor Mosbah, André Lopez, Anne-Marie Sautereau, Gerhard Schaller, Konrad Urech, Pierre Rougé, and Hervé Darbon. 2003. "Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures." *The Biochemical journal* 374 (1):71-78. doi: 10.1042/BJ20030488.
- Crowe, Suzanne M., Spyridon Kintzios, Grigoris Kaltsas, and Clovis S. Palmer. 2019. A Bioelectronic System to Measure the Glycolytic Metabolism of Activated CD4+ T Cells. *Biosensors* 9 (1). doi:10.3390/bios9010010.
- D'Autréaux, Benoît, and Michel B. Toledano. 2007. "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (10):813-824. doi: 10.1038/nrm2256.
- Dai, Z. K., X. S. Yang, and L. M. Yu. 2011. "[Anticancer effect of 5-fluorouracil combined with extract of *Rosa roxburghii* Tratt on human endometrial adenocarcinoma]." *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 31 (8):1108-12, 1117.
- de Bardet, Javier C., Celeste R. Cardentey, Belkis L. González, Deanira Patrone, Idania L. Mulet, Dario Siniscalco, and María D. Robinson-Agramonte. 2023. Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. *BioTech* 12 (1). doi:10.3390/biotech12010014.
- Delebinski, C. I., S. Jaeger, K. Kemnitz-Hassanin, G. Henze, H. N. Lode, and G. J. Seifert. 2012. "A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia." *Cell Prolif* 45 (2):176-87. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00801.x.
- Delebinski, C. I., M. Twardziok, S. Kleinsimon, F. Hoff, K. Mulsow, J. Rolff, S. Jäger, A. Eggert, and G. Seifert. 2015. "A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo." *PLoS One* 10 (8):e0133892. doi: 10.1371/journal.pone.0133892.
- Drozdoff, L., E. Klein, M. Kiechle, and D. Paepke. 2018. "Use of biologically-based complementary medicine in breast and gynecological cancer patients during systemic therapy." *BMC Complement Altern Med* 18 (1):259. doi: 10.1186/s12906-018-2325-3.
- Dumont, J., D. Ewart, B. Mei, S. Estes, and R. Kshirsagar. 2016. "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives." *Crit Rev Biotechnol* 36 (6):1110-1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266.
- Duong-Ly, Krisna C., and Sandra B. Gabelli. 2014. "Chapter Seven - Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation." In *Methods in Enzymology*, edited by Jon Lorsch, 85-94. Academic Press.
- Dupree, Emmalyn J., Madhuri Jayathirtha, Hannah Yorkey, Marius Mihasan, Brindusa Alina Petre, and Costel C. Darie. 2020. "A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of this Field." *Proteomes* 8 (3):14. doi: 10.3390/proteomes8030014.

- Durinikova, E., K. Buzo, and S. Arena. 2021. "Preclinical models as patients' avatars for precision medicine in colorectal cancer: past and future challenges." *J Exp Clin Cancer Res* 40 (1):185. doi: 10.1186/s13046-021-01981-z.
- Duta-Cornescu, G., N. Constantin, D. M. Pojoga, D. Nicuta, and A. Simon-Gruita. 2023. "Somaclonal Variation-Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants." *Int J Mol Sci* 24 (1). doi: 10.3390/ijms24010838.
- Efferth, Thomas. 2019. "Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures." *Engineering* 5 (1):50-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.
- Eggenschwiler, Jenny, Leopold von Balthazar, Bianca Stritt, Doreen Pruntsch, Mac Ramos, Konrad Urech, Lukas Rist, A. Paula Simões-Wüst, and Angelika Viviani. 2007. "Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*)." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 7 (1):14. doi: 10.1186/1472-6882-7-14.
- Eifel, P. J. 2006a. "Chemoradiotherapy in the treatment of cervical cancer." *Semin Radiat Oncol* 16 (3):177-85. doi: 10.1016/j.semradonc.2006.02.007.
- Eifel, P. J. 2006b. "Concurrent chemotherapy and radiation therapy as the standard of care for cervical cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 3 (5):248-55. doi: 10.1038/ncponc0486.
- Ekert, P. G., and D. L. Vaux. 1997. "Apoptosis and the immune system." *Br Med Bull* 53 (3):591-603. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011632.
- Elmore, S. 2007. "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35 (4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Escobar, Juan F., Juan J. Vaca-González, Johana M. Guevara, and Diego A. Garzón-Alvarado. 2020. "Effect of magnetic and electric fields on plasma membrane of single cells: A computational approach." *Engineering Reports* 2 (2):e12125. doi: <https://doi.org/10.1002/eng2.12125>.
- Estko, M., S. Baumgartner, K. Urech, M. Kunz, U. Regueiro, P. Heusser, and U. Weissenstein. 2015. "Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro." *BMC Complement Altern Med* 15:130. doi: 10.1186/s12906-015-0650-3.
- Ewert de Oliveira, Beatriz, Otávio Henrique Junqueira Amorim, Lonetá Lauro Lima, Rodrigo Alvarenga Rezende, Natalia Cammarosano Mestnik, Ediléia Bagatin, and Gislaine Ricci Leonardi. 2021. "5-Fluorouracil, innovative drug delivery systems to enhance bioavailability for topical use." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 61:102155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102155>.
- Fang, Y., and R. M. Eglén. 2017. "Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development." *SLAS Discov* 22 (5):456-472. doi: 10.1177/1087057117696795.
- Felenda, J. E., C. Turek, and F. C. Stintzing. 2019. "Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and purothionin on human cancer cells." *J Ethnopharmacol* 236:100-107. doi: 10.1016/j.jep.2019.02.047.
- Fernald, K., and M. Kurokawa. 2013. "Evading apoptosis in cancer." *Trends Cell Biol* 23 (12):620-33. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.006.
- Florack, D. E., and W. J. Stiekema. 1994. "Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action." *Plant Mol Biol* 26 (1):25-37. doi: 10.1007/bf00039517.
- Focaccetti, C., A. Bruno, E. Magnani, D. Bartolini, E. Principi, K. Dallaglio, E. O. Bucci, G. Finzi, F. Sessa, D. M. Noonan, and A. Albini. 2015. "Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes." *PLoS One* 10 (2):e0115686. doi: 10.1371/journal.pone.0115686.

- Frantz, M., M. L. Jung, G. Ribereau-Gayon, and R. Anton. 2000. "Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins." *Arzneimittelforschung* 50 (5):471-8. doi: 10.1055/s-0031-1300232.
- Franz, H. 1986. "Mistletoe lectins and their A and B chains." *Oncology* 43 Suppl 1:23-34. doi: 10.1159/000226417.
- Freuding, M., C. Keinki, S. Kutschan, O. Micke, J. Buentzel, and J. Huebner. 2019. "Mistletoe in oncological treatment: a systematic review : Part 2: quality of life and toxicity of cancer treatment." *J Cancer Res Clin Oncol* 145 (4):927-939. doi: 10.1007/s00432-018-02838-3.
- Freuding, M., C. Keinki, O. Micke, J. Buentzel, and J. Huebner. 2019. "Mistletoe in oncological treatment: a systematic review : Part 1: survival and safety." *J Cancer Res Clin Oncol* 145 (3):695-707. doi: 10.1007/s00432-018-02837-4.
- Fu, L. L., C. C. Zhou, S. Yao, J. Y. Yu, B. Liu, and J. K. Bao. 2011. "Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents." *Int J Biochem Cell Biol* 43 (10):1442-9. doi: 10.1016/j.biocel.2011.07.004.
- Gadiyar, V., K. C. Lahey, D. Calianese, C. Devoe, D. Mehta, K. Bono, S. Desind, V. Davra, and R. B. Birge. 2020. "Cell Death in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Immunotherapy." *Cells* 9 (10). doi: 10.3390/cells9102207.
- Gandhi, Sumit G., Vidushi Mahajan, and Yashbir S. Bedi. 2015. "Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants." *Planta* 241 (2):303-317. doi: 10.1007/s00425-014-2232-x.
- Gardin, Nilo Esvalter. 2009. "Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series." *Phytotherapy Research* 23 (3):407-411. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.2643>.
- Gehl, J. 2003. "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research." *Acta Physiol Scand* 177 (4):437-47. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.
- Gewies, Andreas. 2003. "Introduction to Apoptosis." *ApoReview*:1-26.
- Ghanian, Zahra, Girija Ganesh Konduri, Said Halim Audi, Amadou K. S. Camara, and Mahsa Ranji. 2018. "Quantitative optical measurement of mitochondrial superoxide dynamics in pulmonary artery endothelial cells." *Journal of innovative optical health sciences* 11 (1):1750018. doi: 10.1142/S1793545817500183.
- Gheorghiu, M. 2020. "A short review on cell-based biosensing: challenges and breakthroughs in biomedical analysis." *J Biomed Res* 35 (4):255-263. doi: 10.7555/jbr.34.20200128.
- Ghorbani, Mahin, and Hamed Karimi. 2015. "Role of Biotechnology in Cancer Control." 5:180-185.
- Giudici, Marcela, Roberto Pascual, Laura de la Canal, Karola Pfüller, Uwe Pfüller, and José Villalaín. 2003. "Interaction of viscotoxins A3 and B with membrane model systems: implications to their mechanism of action." *Biophysical journal* 85 (2):971-981. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74536-6.
- González-Vallinas, M., S. Molina, G. Vicente, A. de la Cueva, T. Vargas, S. Santoyo, M. R. García-Risco, T. Fornari, G. Reglero, and A. Ramírez de Molina. 2013. "Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells." *Pharmacol Res* 72:61-8. doi: 10.1016/j.phrs.2013.03.010.
- Gordon, J. L., M. A. Brown, and M. M. Reynolds. 2018. "Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer." *Diseases* 6 (4). doi: 10.3390/diseases6040085.
- Grabski, A. C. 2009. "Advances in preparation of biological extracts for protein purification." *Methods Enzymol* 463:285-303. doi: 10.1016/s0076-6879(09)63018-4.
- Graziani, Vittoria, Monica Scognamiglio, Valentina Belli, Assunta Esposito, Brigida D'Abrosca, Angela Chambery, Rosita Russo, Marta Panella, Aniello Russo, Fortunato Ciardiello, Teresa Troiani,

- Nicoletta Potenza, and Antonio Fiorentino. 2018. "Metabolomic approach for a rapid identification of natural products with cytotoxic activity against human colorectal cancer cells." *Scientific Reports* 8 (1):5309. doi: 10.1038/s41598-018-23704-9.
- Grossarth-Maticek, R., and R. Ziegler. 2007. "Prospective controlled cohort studies on long-term therapy of cervical cancer patients with a mistletoe preparation (Iscador)." *Forsch Komplementmed* 14 (3):140-7. doi: 10.1159/000102956.
- Gupta, O. P., and Sita Rani. 2011. "Bioinformatics Applications and Tools: An Overview." *Biometrics and Bioinformatics* 3:107-110.
- Gyanani, V., J. C. Haley, and R. Goswami. 2021. "Challenges of Current Anticancer Treatment Approaches with Focus on Liposomal Drug Delivery Systems." *Pharmaceuticals (Basel)* 14 (9). doi: 10.3390/ph14090835.
- Hailu, Haimanot E., Alison M. Mondul, Laura S. Rozek, and Temesgen Geleta. 2020. "Descriptive Epidemiology of breast and gynecological cancers among patients attending Saint Paul's Hospital Millennium Medical College, Ethiopia." *PLOS ONE* 15 (3):e0230625. doi: 10.1371/journal.pone.0230625.
- Hajto, T., K. Hostanska, J. Fischer, and R. Saller. 1997. "Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity." *Anticancer Drugs* 8 Suppl 1:S43-6. doi: 10.1097/00001813-199704001-00010.
- Halasi, Marianna, Ming Wang, Tanmay S. Chavan, Vadim Gaponenko, Nissim Hay, and Andrei L. Gartel. 2013. "ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors." *The Biochemical journal* 454 (2):201-208. doi: 10.1042/BJ20130282.
- Halliwell, B. 2011. "Free radicals and antioxidants - quo vadis?" *Trends Pharmacol Sci* 32 (3):125-30. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002.
- Hammond, W. A., A. Swaika, and K. Mody. 2016. "Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review." *Ther Adv Med Oncol* 8 (1):57-84. doi: 10.1177/1758834015614530.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144 (5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hannen, Ricarda, and Jörg W. Bartsch. 2018. "Essential roles of telomerase reverse transcriptase hTERT in cancer stemness and metastasis." *FEBS Letters* 592 (12):2023-2031. doi: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13084>.
- Hartley, Martin R., John A. Chaddock, and Maureen S. Bonness. 1996. "The structure and function of ribosome-inactivating proteins." *Trends in Plant Science* 1 (8):252. doi: [https://doi.org/10.1016/1360-1385\(96\)10030-3](https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)10030-3).
- Hausman, D. M. 2019. "What Is Cancer?" *Perspect Biol Med* 62 (4):778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046.
- Hu, Haifang, Tao Fan, Xiaoyan Zhao, Xiaowei Zhang, Yali Sun, and Hongkai Liu. 2017. "Influence of pH and salt concentration on functional properties of walnut protein from different extraction methods." *Journal of food science and technology* 54 (9):2833-2841. doi: 10.1007/s13197-017-2721-6.
- Huang, M., J. J. Lu, M. Q. Huang, J. L. Bao, X. P. Chen, and Y. T. Wang. 2012. "Terpenoids: natural products for cancer therapy." *Expert Opin Investig Drugs* 21 (12):1801-18. doi: 10.1517/13543784.2012.727395.
- Huber, Roman, Reinhild Klein, Peter A. Berg, Rainer Lüdtkke, and Michael Werner. 2002. "Effects of a Lectin- and a Viscotoxin-Rich Mistletoe Preparation on Clinical and Hematologic Parameters: A Placebo-Controlled Evaluation in Healthy Subjects." *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8 (6):857-866. doi: 10.1089/10755530260511847.
- Hwang, W. Y., M. H. Kang, S. K. Lee, J. S. Yeom, and M. H. Jung. 2019. "Prolonged stabilization of platinum-refractory ovarian cancer in a single patient undergoing long-term Mistletoe extract

- treatment: Case report." *Medicine (Baltimore)* 98 (8):e14536. doi: 10.1097/md.00000000000014536.
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto, and A. Iwase. 2013. "Plant callus: mechanisms of induction and repression." *Plant Cell* 25 (9):3159-73. doi: 10.1105/tpc.113.116053.
- Inoue, Manami, Motoki Iwasaki, Tetsuya Otani, Shizuka Sasazuki, and Shoichiro Tsugane. 2006. "Public awareness of risk factors for cancer among the Japanese general population: A population-based survey." *BMC Public Health* 6 (1):2. doi: 10.1186/1471-2458-6-2.
- Itakura, Yoko, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Junko Kominami, Hiroaki Tateno, and Jun Hirabayashi. 2017. "Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study." *International journal of molecular sciences* 18 (6):1160. doi: 10.3390/ijms18061160.
- Jäggy, C., H. Musielski, K. Urech, and G. Schaller. 1995. "Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations." *Arzneimittelforschung* 45 (8):905-9.
- Jelińska, Aldona, Anna Zagożdżon, Marcin Górecki, Agnieszka Wisniewska, Jadwiga Frelek, and Robert Holyst. 2017. "Denaturation of proteins by surfactants studied by the Taylor dispersion analysis." *PLOS ONE* 12 (4):e0175838. doi: 10.1371/journal.pone.0175838.
- Kaestner, J., D. Schlodder, C. Preussler, and B. Gruhn. 2019. "Supportive mistletoe therapy in a patient with metastasised neuroblastoma." *BMJ Case Rep* 12 (3). doi: 10.1136/bcr-2018-227652.
- Kakalis, A., V. Tsekouras, S. Mavrikou, G. Moschopoulou, S. Kintzios, E. Evergetis, V. Iliopoulos, S. D. Koulocheri, and S. A. Haroutounian. 2023. "Farm or Lab? A Comparative Study of Oregano's Leaf and Callus Volatile Isolates Chemistry and Cytotoxicity." *Plants (Basel)* 12 (7). doi: 10.3390/plants12071472.
- Kevadiya, Bhavesh D., Tapan A. Patel, Devendrasinh D. Jhala, Rahul P. Thumbar, Harshad Brahmabhatt, Maharshi P. Pandya, Shalini Rajkumar, Prasant K. Jena, Ghanshyam V. Joshi, Pankaj K. Gadhia, C. B. Tripathi, and Hari C. Bajaj. 2012. "Layered inorganic nanocomposites: A promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU)." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 81 (1):91-101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.01.004>.
- Kienle, Gunver S., Anja Glockmann, Michael Schink, and Helmut Kiene. 2009. "Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28 (1):79. doi: 10.1186/1756-9966-28-79.
- Kintzios, S. E. 2007. "Cell-based biosensors in clinical chemistry." *Mini Rev Med Chem* 7 (10):1019-26. doi: 10.2174/138955707782110141.
- Kintzios, S., E. Pistola, J. Konstas, F. Bem, T. Matakadiadis, N. Alexandropoulos, I. Biselis, and R. Levin. 2001. "The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters." *Biosens Bioelectron* 16 (7-8):467-80. doi: 10.1016/s0956-5663(01)00161-0.
- Kintzios, Spiridon. 2008. "Secondary Metabolite Production from Plant Cell Cultures: the Success Stories of Rosmarinic Acid and Taxol." In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, edited by K. G. Ramawat and J. M. Merillon, 85-100. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kintzios, Spiridon, Maria Barberaki, Panagiotis Tourgielis, Georgios Aivalakis, and An Volioti. 2002. "Preliminary Evaluation of Somaclonal Variation for the In Vitro Production of New Toxic Proteins from *Viscum album* L." *Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants*:217-221. doi: 10.1300/J044v09n02_31.
- Kintzios, S, M. Barberaki, J. Drossopoulos, P. Turgelis & J. Konstas. 2003. "Effect of Medium Composition and Explant Source on the Distribution Profiles Selected Micronutrients in Mistletoe Tissue Cultures". *Journal of Plant Nutrition*, 26:2, 369-397, DOI: 10.1081/PLN-120017142
- Kleijnen, J., and P. Knipschild. 1994. "Mistletoe treatment for cancer: review of controlled trials in humans." *Phytomedicine* 1 (3):255-260. doi: 10.1016/S0944-7113(11)80073-5.

- Klein, Reinhild, K. Classen, S. Fischer, M. Errenst, A. Scheffler, G. M Stein, R. Scheer, and Hans Laue. 2002. "Induction of antibodies to viscotoxins A1, A2, A3, and B in tumour patients during therapy with an aqueous mistletoe extract." *European journal of medical research* 7 (8):359-67.
- Klein, Reinhild, M. Franz, R. Wacker, K. Classen, R. Scheer, Hans Laue, S. Stoeva, and Wolfgang Voelter. 2004. "Demonstration of antibodies to the chitin-binding mistletoe lectin (CBML) in tumor patients before and during therapy with an aqueous mistletoe extract." *European journal of medical research* 9 (6):316-22.
- Klett, C. Y., and F. A. Anderer. 1989. "Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract." *Arzneimittelforschung* 39 (12):1580-5.
- Knöpfel-Sidler, F., A. Viviani, Lukas Rist, and Andreas Hensel. 2005. "Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different Mistletoe extracts." *Die Pharmazie* 60 (6):448-54.
- Konopa, J., J. M. Woynarowski, and M. Lewandowska-Gumieniak. 1980. "Isolation of viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361 (10):1525-33. doi: 10.1515/bchm2.1980.361.2.1525.
- Krasnylenko, Yuliya, Eugene Sosnovsky, Natalia Atamas, Grigory Popov, Volodymyr Leonenko, Kateřina Janošíková, Nadiya Sytschak, Karol Rydlo, and Dmytro Sytnyk. 2020. "The European mistletoe (*Viscum album* L.): distribution, host range, biotic interactions and management worldwide with special emphasis on Ukraine." *Botany* 98. doi: 10.1139/cjb-2020-0037.
- Krebs, A., J. Nyffeler, J. Rahnenführer, and M. Leist. 2018. "Normalization of data for viability and relative cell function curves." *Altex* 35 (2):268-271. doi: 10.14573/1803231.
- Kulbacka, Julita, Anna Choromańska, Joanna Rossowska, Joanna Weźgowiec, Jolanta Sączko, and Marie-Pierre Rols. 2017. "Cell Membrane Transport Mechanisms: Ion Channels and Electrical Properties of Cell Membranes." In *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy*, edited by Julita Kulbacka and Saulius Satkauskas, 39-58. Cham: Springer International Publishing.
- Kumar, G. 2018. "Principle and Method of Silver Staining of Proteins Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Methods Mol Biol* 1853:231-236. doi: 10.1007/978-1-4939-8745-0_26.
- Kuttan, G., and R. Kuttan. 1992. "Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistletoe extract (NSC 635089) cellular proliferation." *Cancer Letters* 66 (2):123-130. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90224-J](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90224-J).
- Kuttan, G., D. M. Vasudevan, and R. Kuttan. 1988. "Isolation and identification of a tumour reducing component from mistletoe extract (Iscador)." *Cancer Lett* 41 (3):307-14. doi: 10.1016/0304-3835(88)90292-3.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Latosinska, Agnieszka, Konstantinos Vougas, Manousos Makridakis, Julie Klein, William Mullen, Mahmoud Abbas, Konstantinos Stravodimos, Ioannis Katafigiotis, Axel S. Merseburger, Jerome Zoidakis, Harald Mischak, Antonia Vlahou, and Vera Jankowski. 2015. "Comparative Analysis of Label-Free and 8-Plex iTRAQ Approach for Quantitative Tissue Proteomic Analysis." *PLOS ONE* 10 (9):e0137048. doi: 10.1371/journal.pone.0137048.
- Lavastre, V., M. Pelletier, R. Saller, K. Hostanska, and D. Girard. 2002. "Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases." *J Immunol* 168 (3):1419-27. doi: 10.4049/jimmunol.168.3.1419.

- Lavelle, E. C., G. Grant, A. Pusztai, U. Pfüller, O. Leavy, E. McNeela, K. H. Mills, and D. T. O'Hagan. 2002. "Mistletoe lectins enhance immune responses to intranasally co-administered herpes simplex virus glycoprotein D2." *Immunology* 107 (2):268-74. doi: 10.1046/j.1365-2567.2002.01492.x.
- Lee, Y. G., I. Jung, D. H. Koo, D. Y. Kang, T. Y. Oh, S. Oh, and S. S. Lee. 2019. "Efficacy and safety of *Viscum album* extract (Helixor-M) to treat malignant pleural effusion in patients with lung cancer." *Support Care Cancer* 27 (5):1945-1949. doi: 10.1007/s00520-018-4455-z.
- Li, X., W. Wang, and J. Chen. 2017. "Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research." *Sci China Life Sci* 60 (10):1093-1113. doi: 10.1007/s11427-017-9175-2.
- Liao, A. H., Y. A. Lee, D. L. Lin, H. C. Chuang, J. K. Wang, C. E. Chang, H. T. Li, T. Y. Wu, C. P. Shih, C. H. Wang, and Y. H. Chu. 2023. "Treatment efficacy of low-dose 5-fluorouracil with ultrasound in mediating 5-fluorouracil-loaded microbubble cavitation in head and neck cancer." *Drug Deliv* 30 (1):1-13. doi: 10.1080/10717544.2022.2154410.
- Likhacheva, A., A. Jhingran, D. C. Bodurka, C. Sun, M. Sam, and P. J. Eifel. 2013. "Prospective study of symptom assessment among patients with cervical cancer during concurrent chemoradiotherapy with weekly cisplatin or every-3-week cisplatin and 5-fluorouracil." *Int J Gynecol Cancer* 23 (8):1520-7. doi: 10.1097/IGC.0b013e3182a0c0e5.
- Lima, H. R. S., J. S. da Silva, E. A. de Oliveira Farias, P. R. S. Teixeira, C. Eiras, and L. C. C. Nunes. 2018. "Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs." *Biosens Bioelectron* 108:27-37. doi: 10.1016/j.bios.2018.02.034.
- Lossi, L. 2022. "The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis." *Biochem J* 479 (3):357-384. doi: 10.1042/bcj20210854.
- Lyu, S. Y., S. H. Choi, and W. B. Park. 2002. "Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53." *Arch Pharm Res* 25 (1):93-101. doi: 10.1007/bf02975269.
- Maier, G., and H. H. Fiebig. 2002. "Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro." *Anticancer Drugs* 13 (4):373-9. doi: 10.1097/00001813-200204000-00006.
- Manza, L. L., S. L. Stamer, A. J. Ham, S. G. Codreanu, and D. C. Liebler. 2005. "Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters." *Proteomics* 5 (7):1742-5. doi: 10.1002/pmic.200401063.
- Marvibaigi, Mohsen, Eko Supriyanto, Neda Amini, Fadzilah Adibah Abdul Majid, and Saravana Kumar Jaganathan. 2014. "Preclinical and Clinical Effects of Mistletoe against Breast Cancer." *BioMed Research International* 2014:15. doi: 10.1155/2014/785479.
- Matthiesen, R., and J. Bunkenborg. 2013. "Introduction to mass spectrometry-based proteomics." *Methods Mol Biol* 1007:1-45. doi: 10.1007/978-1-62703-392-3_1.
- Mavrikou, S., V. Tsekouras, M. A. Karageorgou, G. Moschopoulou, and S. Kintzios. 2019. "Detection of Superoxide Alterations Induced by 5-Fluorouracil on HeLa Cells with a Cell-Based Biosensor." *Biosensors* 9 (4). doi: 10.3390/bios9040126.
- Mavrikou, Sophia, Evangelia Flampouri, Dimitris Iconomou, and Spyridon Kintzios. 2017. "Development of a cellular biosensor for the detection of aflatoxin B1, based on the interaction of membrane engineered Vero cells with anti-AFB1 antibodies on the surface of gold nanoparticle screen printed electrodes." *Food Control* 73:64-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.002>.
- Mavrikou, Sophie, Vasileios Tsekouras, Maria-Argyro Karageorgou, Georgia Moschopoulou, and Spyridon Kintzios. 2020. "Anticancer and biochemical effects of *Viscum album* L. protein extracts on HeLa cells." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 140 (2):369-378. doi: 10.1007/s11240-019-01733-0.

- McIlwain, D. R., T. Berger, and T. W. Mak. 2013. "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- Melville, A., A. Eastwood, J. Kleijnen, H. Kitchener, P. Martin-Hirsch, and L. Nelson. 1999. "Management of gynaecological cancers." *Qual Health Care* 8 (4):270-9. doi: 10.1136/qshc.8.4.270.
- Meneghello, A., S. Tartaglia, M. D. Alvau, F. Polo, and G. Toffoli. 2018. "Biosensing Technologies for Therapeutic Drug Monitoring." *Curr Med Chem* 25 (34):4354-4377. doi: 10.2174/0929867324666170720101736.
- Mengs, U., D. Göthel, and E. Leng-Peschlow. 2002. "Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research." *Anticancer Res* 22 (3):1399-1407.
- Miękus, Natalia, Ilona Olędzka, Alina Plenis, Zofia Woźniak, Anna Lewczuk, Patrycja Koszałka, Barbara Seroczyńska, and Tomasz Bączek. 2015. "Gel electrophoretic separation of proteins from cultured neuroendocrine tumor cell lines." *Mol Med Rep* 11 (2):1407-1415. doi: 10.3892/mmr.2014.2864.
- Mirabelli, P., L. Coppola, and M. Salvatore. 2019. "Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research." *Cancers (Basel)* 11 (8). doi: 10.3390/cancers11081098.
- Misyri, Vasiliki, Vasileios Tsekouras, Vassilios Iliopoulos, Sophia Mavrikou, Epameinondas Evergetis, Georgia Moschopoulou, Spyridon Kintzios, and Serkos A. Haroutounian. 2021. "Farm or lab? Chamazulene content of *Artemisia arborescens* (Vill.) L. essential oil and callus volatile metabolites isolate." *Industrial Crops and Products* 160:113114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113114>.
- Miura, Koh, Makoto Kinouchi, Kazuyuki Ishida, Wataru Fujibuchi, Takeshi Naitoh, Hitoshi Ogawa, Toshinori Ando, Nobuki Yazaki, Kazuhiro Watanabe, Sho Haneda, Chikashi Shibata, and Iwao Sasaki. 2010. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers* 2 (3): 1717-1730. doi:10.3390/cancers2031717.
- Miyamoto, Yoshitaka, Masashi Ikeuchi, Hirofumi Noguchi, and Shuji Hayashi. 2018. "Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at -80 °C for 8 Years." *Cell medicine* 10:2155179017733148-2155179017733148. doi: 10.1177/2155179017733148.
- Möckel, B., T. Schwarz, H. Zinke, J. Eck, M. Langer, and H. Lentzen. 1997. "Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines." *Arzneimittelforschung* 47 (10):1145-51.
- Moschopoulou, G.; , and S. Kintzios. 2015. "Non-invasive Superoxide Monitoring of In Vitro Neuronal Differentiation Using a Cell-Based Biosensor." *J SENSORS*. doi: 10.1155/2015/768352.
- Moschopoulou, Georgia, and Spiridon Kintzios. 2006. "Application of "membrane-engineering" to bioelectric recognition cell sensors for the ultra-sensitive detection of superoxide radical: A novel biosensor principle." *Analytica Chimica Acta* 573-574:90-96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.089>.
- Moschopoulou, Georgia, Teresa Valero, and Spiridon Kintzios. 2011. "Molecular Identification through Membrane Engineering as a Revolutionary Concept for the Construction of Cell Sensors with Customized Target Recognition Properties: the Example of Superoxide Detection." *Procedia Engineering* 25:1541-1544. doi: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.381>.
- Moschopoulou, Georgia, Teresa Valero, and Spiridon Kintzios. 2012. "Superoxide determination using membrane-engineered cells: An example of a novel concept for the construction of cell sensors with customized target recognition properties." *Sensors and Actuators B: Chemical* 175:78-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.12.056>.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1):55-63. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

- Mueller, E. A., and F. A. Anderer. 1990. "Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album* rhamnolacturonan enhancing cytotoxicity of human NK cells." *Immunopharmacology* 19 (1):69-77. doi: 10.1016/0162-3109(90)90028-d.
- Mulsow, K., T. Enzlein, C. Delebinski, S. Jaeger, G. Seifert, and M. F. Melzig. 2016. "Impact of Mistletoe Triterpene Acids on the Uptake of Mistletoe Lectin by Cultured Tumor Cells." *PLoS One* 11 (4):e0153825. doi: 10.1371/journal.pone.0153825.
- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15 (3):473-497. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Musaogullari, A., A. Mandato, and Y. C. Chai. 2020. "Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation on Caspase-3 Activation: A Study With the Kinase Inhibitor Staurosporine." *Front Physiol* 11:998. doi: 10.3389/fphys.2020.00998.
- Mylo, Max D., Mara Hofmann, Alexander Delp, Ronja Scholz, Frank Walther, Thomas Speck, and Olga Speck. 2021. "Advances on the Visualization of the Internal Structures of the European Mistletoe: 3D Reconstruction Using Microtomography." *Frontiers in Plant Science* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.715711.
- Nakamura, Hajime, and Kohichi Takada. 2021. "Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions." *Cancer Science* 112 (10):3945-3952. doi: <https://doi.org/10.1111/cas.15068>.
- Nehdi, A., R. Ali, A. Alhallaj, H. Alzahrani, N. Samman, A. Mashhour, O. Baz, T. Barhoumi, B. Alghanem, A. Khan, L. Alriyees, and M. Boudjelal. 2019. "Nuclear Receptors Are Differentially Expressed and Activated in KAIMRC1 Compared to MCF7 and MDA-MB231 Breast Cancer Cells." *Molecules* 24 (11). doi: 10.3390/molecules24112028.
- Newman, David J., and Gordon M. Cragg. 2016. "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014." *Journal of Natural Products* 79 (3):629-661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- Ng, Neville Shaun, and Lezanne Ooi. 2021. A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. In *Bio-protocol: Bio-protocol LLC*.
- Niu, N., and L. Wang. 2015. "In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs." *Pharmacogenomics* 16 (3):273-85. doi: 10.2217/pgs.14.170.
- Nosaka, K., K. Shibata, F. Utsumi, K. Yoshida, K. Niimi, R. Sekiya, S. Suzuki, H. Kajiyama, and F. Kikkawa. 2016. "Feasibility and benefit of concurrent chemoradiotherapy for elderly patients with uterine cervical cancer." *Tumori* 102 (6):600-605. doi: 10.5301/tj.5000530.
- Ochocka, J. Renata, and Arkadiusz Piotrowski. 2002. "Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.)1." *Canadian Journal of Plant Pathology* 24 (1):21-28. doi: 10.1080/07060660109506966.
- Ohtani, T., M. Hatori, H. Ito, K. Takizawa, R. Kamijo, and M. Nagumo. 2000. "Involvement of caspases in 5-FU induced apoptosis in an oral cancer cell line." *Anticancer Res* 20 (5a):3117-21.
- Olsnes, S., F. Stirpe, K. Sandvig, and A. Pihl. 1982. "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)." *Journal of Biological Chemistry* 257 (22):13263-13270. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33440-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33440-9).
- Ostermann, Thomas, Christa Raak, and Arndt Büssing. 2009. "Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review." *BMC Cancer* 9 (1):451. doi: 10.1186/1471-2407-9-451.
- Park, Y. K., Y. R. Do, and B. C. Jang. 2012. "Apoptosis of K562 leukemia cells by *Abnobaviscum* F[®], a European mistletoe extract." *Oncol Rep* 28 (6):2227-32. doi: 10.3892/or.2012.2026.
- Patel, Seema, and Suryakanta Panda. 2014. "Emerging roles of mistletoes in malignancy management." *3 Biotech* 4 (1):13-20. doi: 10.1007/s13205-013-0124-6.

- Pelzer, F., W. Tröger, and D. R. Nat. 2018. "Complementary Treatment with Mistletoe Extracts During Chemotherapy: Safety, Neutropenia, Fever, and Quality of Life Assessed in a Randomized Study." *J Altern Complement Med* 24 (9-10):954-961. doi: 10.1089/acm.2018.0159.
- Peterson, Quinn P., David R. Goode, Diana C. West, Rachel C. Botham, and Paul J. Hergenrother. 2010. "Preparation of the caspase-3/7 substrate Ac-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis." *Nature protocols* 5 (2):294-302. doi: 10.1038/nprot.2009.223.
- Peumans, Willy J., Peter Verhaert, Uwe Pfüller, and Els J. M. Van Damme. 1996. "Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*)." *FEBS Letters* 396 (2):261-265. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01108-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01108-8).
- Plaxton, W. C. 2019. "Avoiding Proteolysis during the Extraction and Purification of Active Plant Enzymes." *Plant Cell Physiol* 60 (4):715-724. doi: 10.1093/pcp/pcz028.
- Potriquet, Jeremy, Marut Laohaviroj, Jeffrey M. Bethony, and Jason Mulvenna. 2017. "A modified FASP protocol for high-throughput preparation of protein samples for mass spectrometry." *PloS one* 12 (7):e0175967-e0175967. doi: 10.1371/journal.pone.0175967.
- Prasad, Ankush, Pavel Pospíšil, and Mika Tada. 2019. "Editorial: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Methods in Biological System." *Frontiers in physiology* 10:1316-1316. doi: 10.3389/fphys.2019.01316.
- Rai, Yogesh, Richa Pathak, Neeraj Kumari, Dhananjay Kumar Sah, Sanjay Pandey, Namita Kalra, Ravi Soni, B. S. Dwarakanath, and Anant Narayan Bhatt. 2018. "Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition." *Scientific Reports* 8 (1):1531. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.
- Rath, Arianna, Fiona Cunningham, and Charles M. Deber. 2013. "Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (39):15668-15673. doi: 10.1073/pnas.1311305110.
- Reddy, Pulimamidi Rabindra, and Nomula Raju. 2012. Gel-Electrophoresis and Its Applications. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, edited by Sameh Magdeldin: IntechOpen.
- Reed, Nicholas S., and Azmat H. Sadozye. 2016. "Update on chemotherapy in gynaecological cancers." *The Obstetrician & Gynaecologist* 18 (3):182-188. doi: <https://doi.org/10.1111/tog.12270>.
- Reynel, M., Y. Villegas, H. Kiene, P. G. Werthmann, and G. S. Kienle. 2018. "Intralesional and subcutaneous application of *Viscum album* L. (European mistletoe) extract in cervical carcinoma in situ: A CARE compliant case report." *Medicine (Baltimore)* 97 (48):e13420. doi: 10.1097/md.00000000000013420.
- Richter, M., O. Piwocka, M. Musielak, I. Piotrowski, W. M. Suchorska, and T. Trzeciak. 2021. "From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines." *Front Cell Dev Biol* 9:711381. doi: 10.3389/fcell.2021.711381.
- Riss, TL, RA Moravec, and AL Niles. 2013 "Assay Guidance Manual " In *Cell Viability Assays*, ed S Markossian, GS Sittampalam and A Grossman. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- Robev, Bozhil, Ivan Iliev, Iana Tsoneva, Albena Momchilova, Alexandrina Nesheva, Aneliya Kostadinova, Galya Staneva, and Biliiana Nikolova. 2023. "Antitumor Effect of Iscador on Breast Cancer Cell Lines with Different Metastatic Potential." *International Journal of Molecular Sciences* 24 (6):5247.
- Romagnoli, Silvia, Federico Fogolari, Maddalena Catalano, Lucia Zetta, Gerhard Schaller, Konrad Urech, Matteo Giannattasio, Laura Ragona, and Henriette Molinari. 2003. "NMR Solution Structure of Viscotoxin C1 from *Viscum album* Species *Coloratum* ohwi: Toward a Structure–Function Analysis of Viscotoxins." *Biochemistry* 42 (43):12503-12510. doi: 10.1021/bi034762t.

- Roy, Suvra, and Vikash Kumar. 2014. "A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein." *International Journal of Science and Research (IJSR)*.
- Saeui, C. T., M. P. Mathew, L. Liu, E. Urias, and K. J. Yarema. 2015. "Cell Surface and Membrane Engineering: Emerging Technologies and Applications." *J Funct Biomater* 6 (2):454-85. doi: 10.3390/jfb6020454.
- Santos, Neyliane F.G. Dos, Rafael F. Silva, Marcela M.P.L. Pinto, Edvane B. Da Silva, Deborah R. Tasat, and Ademir Amaral. 2017. "Active caspase-3 expression levels as bioindicator of individual radiosensitivity." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89:649-659.
- Sato, M., M. Hosokawa, and M. Doi. 2011. "Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: a study quantifying mutated cells in Saintpaulia." *PLoS ONE* 6:e23541. doi: 10.1371/journal.pone.0023541.
- Schad, Friedemann, and Anja Thronicke. 2023. "Safety of Combined Targeted and Helixor® Viscum album L. Therapy in Breast and Gynecological Cancer Patients, a Real-World Data Study." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20 (3):2565.
- Schaller, G., K. Urech, and M. Giannattasio. 1996. "Cytotoxicity of Different Viscotoxins and Extracts from the European Subspecies of *Viscum album* L." *Phytotherapy Research* 10 (6):473-477. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199609\)10:6<473::AID-PTR879>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199609)10:6<473::AID-PTR879>3.0.CO;2-Q).
- Schaller, G., K. Urech, G. Grazi, and M. Giannattasio. 1998. "Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*." *Planta Med* 64 (7):677-8. doi: 10.1055/s-2006-957553.
- Scheer, R., M. Errenst, and A. Scheffler. 1995. "Wirtsbaumbedingte Unterschiede von Mistelpräparaten." *Dtsch Zschr Onkol* 27:143-149.
- Schieber, M., and N. S. Chandel. 2014. "ROS function in redox signaling and oxidative stress." *Curr Biol* 24 (10):R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Schmidt, Andreas, Ignasi Forne, and Axel Imhof. 2014. "Bioinformatic analysis of proteomics data." *BMC Systems Biology* 8 (2):S3. doi: 10.1186/1752-0509-8-S2-S3.
- Schnell-Inderst, P., C. Steigenberger, M. Mertz, I. Otto, M. Flatscher-Thöni, and U. Siebert. 2022. "Additional treatment with mistletoe extracts for patients with breast cancer compared to conventional cancer therapy alone - efficacy and safety, costs and cost-effectiveness, patients and social aspects, and ethical assessment." *Ger Med Sci* 20:Doc10. doi: 10.3205/000312.
- Schnurr, B., T. Ahrens, and U. Regenass. 2007. "3.27 - Optical Assays in Drug Discovery." In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, edited by John B. Taylor and David J. Triggle, 577-598. Oxford: Elsevier.
- Schötterl, S., S. M. Huber, H. Lentzen, M. Mittelbronn, and U. Naumann. 2018. "Adjuvant Therapy Using Mistletoe Containing Drugs Boosts the T-Cell-Mediated Killing of Glioma Cells and Prolongs the Survival of Glioma Bearing Mice." *Evid Based Complement Alternat Med* 2018:3928572. doi: 10.1155/2018/3928572.
- Schrader, Gesine, and Klaus Apel. 1991. "Isolation and characterization of cDNAs encoding viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*)." *European Journal of Biochemistry* 198 (3):549-553. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16049.x.
- Schulze, E.-D., N. C. Turner, and G. Glatzel. 1984. "Carbon, water and nutrient relations of two mistletoes and their hosts: A hypothesis*." *Plant, Cell & Environment* 7 (5):293-299. doi: <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11589756>.
- Shalini, S., L. Dorstyn, S. Dawar, and S. Kumar. 2015. "Old, new and emerging functions of caspases." *Cell death and differentiation* 22 (4):526-539. doi: 10.1038/cdd.2014.216.
- Shang, Weihu, Jinping Qiao, Chenxin Gu, Wei Yin, Jinglei Du, Wei Wang, Meilin Zhu, Mei Han, and Weidong Lu. 2011. "Anticancer activity of an extract from needles and twigs of *Taxus cuspidata*

- and its synergistic effect as a cocktail with 5-fluorouracil." *BMC Complement Altern Med*. 11:123-123. doi: 10.1186/1472-6882-11-123.
- Sharga, Boris, Diana Pylypiv, and Volodymir Feketa. 2018. "Practical 5. The estimation of the number of cells in suspension or culture using hemocytometer." In *MEDICAL BIOLOGY PRACTICALS. CYTOLOGY* 47-50. Uzhhorod National University.
- Sharma, Anurag, Arpan Modi, and Nitish Kumar. 2022. "Chapter 16 - The role of plant tissue culture in pharmaceuticals and secondary metabolites production." In *Advances in Plant Tissue Culture*, edited by Avinash Chandra Rai, Ajay Kumar, Arpan Modi and Major Singh, 357-372. Academic Press.
- Shewry, Peter R., and Roger J. Fido. 1996. "Protein Extraction from Plant Tissues." In *Protein Purification Protocols*, edited by Shawn Doonan, 23-29. Totowa, NJ: Humana Press.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal. 2019. "Cancer statistics, 2019." *CA Cancer J Clin* 69 (1):7-34. doi: 10.3322/caac.21551.
- Sies, Helmut. 2020. *Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects*. *Antioxidants* 9 (9). doi:10.3390/antiox9090852.
- Somogyi, Arpad. 2008. "Mass spectrometry instrumentation and techniques." In, 93-140.
- Stammer, R. M., S. Kleinsimon, J. Rolff, S. Jäger, A. Eggert, G. Seifert, and C. I. Delebinski. 2017. "Synergistic Antitumour Properties of viscumTT in Alveolar Rhabdomyosarcoma." *J Immunol Res* 2017:4874280. doi: 10.1155/2017/4874280.
- Staupe, Henrike, Judith Buentzel, Christian Keinki, Jens Buentzel, and Jutta Huebner. 2023. "Systematic analysis of mistletoe prescriptions in clinical studies." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 149 (9):5559-5571. doi: 10.1007/s00432-022-04511-2.
- Stec, B. 2006. "Plant thionins – the structural perspective." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (12):1370-1385. doi: 10.1007/s00018-005-5574-5.
- Steigenberger, Caroline, Petra Schnell-Inderst, Magdalena Flatscher-Thöni, Lisa-Maria Plank, and Uwe Siebert. 2023. "Patient' and social aspects related to complementary mistletoe therapy in patients with breast cancer: A systematic review commissioned by the German agency for Health Technology Assessment." *European Journal of Oncology Nursing* 65:102338. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejon.2023.102338>.
- Stein, G., G. Schaller, Uwe Pfueller, M. Schietzel, and Arndt Büssing. 1999. "Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes." *Anticancer research* 19 (2A):1037-42.
- Strüh, C. M., S. Jäger, C. M. Schempp, A. Scheffler, and S. F. Martin. 2012. "A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells." *Phytother Res* 26 (10):1507-12. doi: 10.1002/ptr.4604.
- Sullivan, Lucas B., and Navdeep S. Chandel. 2014. "Mitochondrial reactive oxygen species and cancer." *Cancer & Metabolism* 2 (1):17. doi: 10.1186/2049-3002-2-17.
- Suski, J. M., M. Lebedzinska, M. Bonora, P. Pinton, J. Duszynski, and M. R. Wieckowski. 2012. "Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation." *Methods Mol Biol* 810:183-205. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_12.
- Switzar, Linda, Martin Giera, and Wilfried M. A. Niessen. 2013. "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments." *Journal of Proteome Research* 12 (3):1067-1077. doi: 10.1021/pr301201x.
- Tabiasco, Julie, Frédéric Pont, Jean-Jacques Fournié, and Alain Vercellone. 2002. "Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity." *European Journal of Biochemistry* 269 (10):2591-2600. doi: doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02932.x.

- Tabita, F. Robert, Thomas E. Hanson, Huiying Li, Sriram Satagopan, Jaya Singh, and Sum Chan. 2007. "Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (4):576. doi: 10.1128/MMBR.00015-07.
- Tangjitgamol, S., K. Katanyoo, M. Laopaiboon, P. Lumbiganon, S. Manusirivithaya, and B. Supawattanabodee. 2014. "Adjuvant chemotherapy after concurrent chemoradiation for locally advanced cervical cancer." *Cochrane Database Syst Rev* 2014 (12):Cd010401. doi: 10.1002/14651858.CD010401.pub2.
- Tonevitsky, A. G., Agapov, I. B. Pevzner, N. V. Maluchenko, M. M. Moisenovich, R. A. Palmer, M. Yurkova, K. Pfüller, and U. Pfüller. 2004. "A new gene encoding the ribosome-inactivating protein from mistletoe extracts." *Arzneimittelforschung* 54 (4):242-9. doi: 10.1055/s-0031-1296966.
- Tsekouras, Vasileios. 2019. "Plant Lectins in Cancer Treatment: The Case of *Viscum album* L." In *Plants That Fight Cancer*, edited by Maria Barberaki Spyridon Kintzios, Evangelia Flampouri. Boca Raton: CRC Press.
- Tsekouras, Vasileios, Sophie Mavrikou, Dimitrios Vlachakis, Manousos Makridakis, Rafael Stroggilos, Jerome Zoidakis, Aikaterini Termentzi, Georgia Moschopoulou, and Spyridon Kintzios. 2020. "Proteome analysis of leaf, stem and callus in *Viscum album* and identification of lectins and viscotoxins with bioactive properties." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 141 (1):167-178. doi: 10.1007/s11240-020-01777-7.
- Tsekouras, Vasileios., and Spyridon. Kintzios. 2020. "Biotechnology of *Viscum Album* L. and Cancer Treatment: A Review." *Current Bioactive Compounds* 16 (6). doi: <https://dx.doi.org/10.2174/1573407215666190410151958>.
- Twardziok, M., D. Meierhofer, S. Börno, B. Timmermann, S. Jäger, S. Boral, A. Eggert, C. I. Delebinski, and G. Seifert. 2017. "Transcriptomic and proteomic insight into the effects of a defined European mistletoe extract in Ewing sarcoma cells reveals cellular stress responses." *BMC Complement Altern Med* 17 (1):237. doi: 10.1186/s12906-017-1715-2.
- Ueno, M., Y. Kakinuma, K. Yuhki, N. Murakoshi, M. Iemitsu, T. Miyauchi, and I. Yamaguchi. 2006. "Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo." *J Pharmacol Sci*. 101 (2):151-158. doi: 10.1254/jphs.FP0050980.
- Urech, K., J. M. Scher, K. Hostanska, and H. Becker. 2005. "Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L." *J Pharm Pharmacol* 57 (1):101-9. doi: 10.1211/0022357055083.
- Urech, Konrad, Gerhard Schaller, and Christoph Jäggy. 2006. "Viscotoxins, Mistletoe Lectins and their Isoforms in Mistletoe (*Viscum album* L.) Extracts Iscador." *Arzneimittelforschung* 56 (06):428-434. doi: 10.1055/s-0031-1296808.
- Vagenende, V., M. G. Yap, and B. L. Trout. 2009. "Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol." *Biochemistry* 48 (46):11084-96. doi: 10.1021/bi900649t.
- van Meerloo, J., G. J. Kaspers, and J. Cloos. 2011. "Cell sensitivity assays: the MTT assay." *Methods Mol Biol* 731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- Vicaș, Simona Ioana, and Carmen Socaciu. 2008. "THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF EUROPEAN MISTLETOE (*Viscum album*) EXTRACTS AND THEIR PHARMACEUTICAL IMPACT." *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture* 63. doi: 10.15835/buasvmcn-agr:1344.
- Villalpando-Rodriguez, Gloria E., and Spencer B. Gibson. 2021. "Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021:9912436. doi: 10.1155/2021/9912436.

- Vishnoi, K., S. Mahata, A. Tyagi, A. Pandey, G. Verma, M. Jadli, T. Singh, S. M. Singh, and A. C. Bharti. 2016. "Human papillomavirus oncoproteins differentially modulate epithelial-mesenchymal transition in 5-FU-resistant cervical cancer cells." *Tumour Biol* 37 (10):13137-13154. doi: 10.1007/s13277-016-5143-6.
- Voelter, W., R. Wacker, M. Franz, T. Maier, and S. Stoeva. 2000. "Complete Structural Characterization of a Chitin-Binding Lectin from Mistletoe Extracts." *Journal für praktische Chemie* 342 (8):812-818. doi: doi:10.1002/1521-3897(200010)342:8<812::AID-PRAC812>3.0.CO;2-J.
- Voelter, Wolfgang, Roland Wacker, Stanka Stoeva, Rania Tsitsilonis, and Christian Betzel. 2005. "Mistletoe Lectins, Structure and Function." *Frontiers in Natural Product Chemistry* 1 (1):149-162. doi: 10.2174/1574089054583597.
- Wagner, H., E. Jordan, and B. Feil. 1986. "Studies on the standardization of mistletoe preparations." *Oncology reports* 43 (Suppl 1):16-22. doi: 10.1159/000226416.
- Wang, C., and R. J. Youle. 2009. "The role of mitochondria in apoptosis*." *Annu Rev Genet* 43:95-118. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134850.
- Wang, Guangyi, Weiping Tang, and Robert R. Bidigare. 2005. "Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents." In *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, edited by Lixin Zhang and Arnold L. Demain, 197-227. Totowa, NJ: Humana Press.
- Wang, Q., L. Zhang, X. Yuan, Y. Ou, X. Zhu, Z. Cheng, P. Zhang, X. Wu, Y. Meng, and L. Zhang. 2016. "The Relationship between the Bcl-2/Bax Proteins and the Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway in the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells into Neurons." *PLoS One* 11 (10):e0163327. doi: 10.1371/journal.pone.0163327.
- Wang, S., E.A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi, and B. Kalyanaraman. 2004. "Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms." *J Biol Chem* 279 (24):25535–25543. doi: 10.1074/jbc.M400944200.
- Wang, W., J. Cassidy, V. O'Brien, K. M. Ryan, and E. Collie-Duguid. 2004. "Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells." *Cancer Res* 64 (22):8167-76. doi: 10.1158/0008-5472.Can-04-0970.
- Wang, W., F. Tai, and S. Chen. 2008. "Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis." *Journal of separation science* 31 (11):2032-9. doi: 10.1002/jssc.200800087.
- Werthmann, P. G., R. Kempenich, and G. S. Kienle. 2018. "Long-Term Tumor-Free Survival in a Patient with Stage IV Epithelial Ovarian Cancer Undergoing High-Dose Chemotherapy and *Viscum album* Extract Treatment: A Case Report." *Perm J* 23:18-025. doi: 10.7812/tpj/18-025.
- Werthmann, Paul G., Alexander Hintze, and Gunver S. Kienle. 2017. "Complete remission and long-term survival of a patient with melanoma metastases treated with high-dose fever-inducing *Viscum album* extract: A case report." *Medicine* 96 (46):e8731-e8731. doi: 10.1097/MD.00000000000008731.
- Wilding, Jennifer, and Walter Bodmer. 2014. "Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development." *Cancer research* 74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2971.
- Wilson, Claire H., and Sharad Kumar. 2018. "Caspases in metabolic disease and their therapeutic potential." *Cell death and differentiation* 25 (6):1010-1024. doi: 10.1038/s41418-018-0111-x.
- Wingfield, P. 2001a. "Protein precipitation using ammonium sulfate." *Current protocols in protein science Appendix 3:Appendix-3F*. doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- Wingfield, P. T. 2001b. "Use of protein folding reagents." *Current protocols in protein science Appendix 3:Appendix-3A*. doi: 10.1002/0471140864.psa03as00.
- Wiśniewski, Jacek R., Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj, and Matthias Mann. 2009. "Universal sample preparation method for proteome analysis." *Nature Methods* 6:359. doi: 10.1038/nmeth.1322

- <https://www.nature.com/articles/nmeth.1322#supplementary-information>.
- Wong, R. S. 2011. "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." *J Exp Clin Cancer Res* 30 (1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
- Wu, X., F. Gong, and W. Wang. 2014. "Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis." *Proteomics* 14 (6):645-58. doi: 10.1002/pmic.201300239.
- Xu, Liangliang, Chang Zou, Shanshan Zhang, Timothy Shun Man Chu, Yan Zhang, Weiwei Chen, Caining Zhao, Li Yang, Zhiyuan Xu, Shaowei Dong, Hao Yu, Bo Li, Xinyuan Guan, Yuzhu Hou, and Feng-Ming Kong. 2022. "Reshaping the systemic tumor immune environment (STIE) and tumor immune microenvironment (TIME) to enhance immunotherapy efficacy in solid tumors." *Journal of Hematology & Oncology* 15 (1):87. doi: 10.1186/s13045-022-01307-2.
- Yang, Shi Yu, Kevin M. Sales, Barry Fuller, Alexander M. Seifalian, and Marc C. Winslet. 2009. "Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy." *Trends in Molecular Medicine* 15 (5):225-233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.003>.
- Younus, H. 2018. "Therapeutic potentials of superoxide dismutase." *International journal of health sciences* 12 (3):88-93.
- Yousefvand, S., F. Fattahi, S. M. Hosseini, K. Urech, and G. Schaller. 2022. "Viscotoxin and lectin content in foliage and fruit of *Viscum album* L. on the main host trees of Hyrcanian forests." *Sci Rep* 12 (1):10383. doi: 10.1038/s41598-022-14504-3.
- Zhang, W., and M. E. Dolan. 2009. "Use of cell lines in the investigation of pharmacogenetic loci." *Curr Pharm Des* 15 (32):3782-95. doi: 10.2174/138161209789649475.
- Zhang, Wenyang, Zhiwei Yuan, Lulu Huang, Jie Kang, Ruwei Jiang, and Hongying Zhong. 2016. "Titanium Dioxide Photocatalytic Polymerization of Acrylamide for Gel Electrophoresis (TIPPAGE) of Proteins and Structural Identification by Mass Spectrometry." *Scientific Reports* 6 (1):20981. doi: 10.1038/srep20981.
- Zhang, Y., G. Talmon, and J. Wang. 2015. "MicroRNA-587 antagonizes 5-FU-induced apoptosis and confers drug resistance by regulating PPP2R1B expression in colorectal cancer." *Cell Death & Disease* 6 (8):e1845-e1845. doi: 10.1038/cddis.2015.200.
- Zhang, Yinfeng, Menghong Dai, and Zonghui Yuan. 2018. "Methods for the detection of reactive oxygen species." *Analytical Methods* 10 (38):4625-4638. doi: 10.1039/C8AY01339J.
- Zuber, Doris. 2004. "Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L." *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199 (3):181-203. doi: <https://doi.org/10.1078/0367-2530-00147>.

Παράρτημα

Πίνακας 1: Ρύθμιση κορεσμού διαλύματος με τη χρήση θειικού αμμωνίου (NH₄)₂SO₄)

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38